

## 利用微生物制备的真菌免疫调节蛋白及其用途

### 技术领域

本发明涉及一段改良后的核酸分子，该核酸分子转译真菌免疫调节蛋白(Fungal Immunomodulatory Protein)，可以在真菌有较佳的表达。本发明还涉及包含该核酸分子的表达载体、此表达载体转形的宿主细胞、表达本发明的蛋白质于此转形宿主细胞的方法、包含本发明蛋白质的宿主细胞的用途及纯化真菌免疫调节蛋白的方法。本发明的蛋白质具有广泛的免疫调节功能(immunomodulatory activity)。因此本发明进一步涉及本发明蛋白质在化妆品或医药组合物的用途及含本发明蛋白质的食品或饲料添加物组合物。最后，本发明涉及个体口服真菌免疫调节蛋白或与真菌免疫调节蛋白融合的蛋白以调节免疫活性的方法。

### 背景技术

在植物或蕈类植物的子实体或菌丝体有些亲糖蛋白质(Lectin)，在医学报导上有免疫调节(Immunomodulatory)及保护肝脏(Hepatoprotective)的活性，可能具有清除自由基的功能(Lin J.M. et al., *Am J Chin Med.* 1993;21(1): 59-69)。由桑寄生(mistletoe)植物分离出的亲糖蛋白  $\beta$ -半乳糖苷( $\beta$ -galactoside)为专一性的亲糖蛋白，不论在活体外(*In vitro*)及活体中(*In vivo*)皆会促进细胞激素(cytokine)的增生(Gabius H. J. et al., *Anticancer Res.* 1992 May-Jun;12(3): 669-75)。在以 Balb/C 小鼠作为疾病模式测试中，亲糖蛋白质及重组亲糖蛋白质都可抑制肿瘤的形成。(Couraud P.O. et al., *J. Biol. Chem.* 1989; 264:1310-1316)。

灵芝(Ganoderma)是很有经济价值的中药，灵芝的种类很多例如：灵芝(*G. lucidum*) (红色)，树舌灵芝(*G. applanatum*) (棕色)，松杉灵芝(*G. tsugae*) (红色)，紫灵芝(*G. sinense*) (黑色)及灵芝(*G. oregonense*) (暗棕色)。

一些食用菇类，例如灵芝、草菇及金针菇中所纯化的蛋白质中皆具有类似的氨基酸序列及免疫调节功能，这类蛋白质被命名为真菌类免疫调节蛋白(Fungal Immunomodulatory Protein)简称 FIP (Ko J.L., *Eur. J. Biochem.* 1995; 228:224-249)。图 3 为三种真菌类免疫调节蛋白氨基酸序列的比较。其中尤以灵芝最具代表性。灵芝为健康食品中的一员，对维持人体健康有莫大助益。

过去研究发现灵芝具有抗过敏性(Chen H.Y et al., *J. Med. Mycol.* 1992; 33: 505-512)、保护肝脏功能(Lin J.M. et al., *Am J Chin Med.* 1993;21(1): 59-69)、抗肿瘤及增强免疫功能，但大多局限于粗萃取物(Horner W.E. et al., *Allergy* 1993; 48:

110-116) 或小分子化合物方面研究 (Kawagishi H., et al., *Phytochemistry* 1993; 32: 239-241)。日本明治制药则从灵芝纯化出免疫调节蛋白(LZ-8), 发现具有抑制全身过敏反应、治疗肝癌及预防糖尿病等功能 (Kino K. et al., *J. Biol Chem.* 1989; Jan 5; 264(1): 472-8)。柯(1995)亦从另一可食用的菇类--金针菇中获得免疫调节蛋白(FIP-fve); 发现该蛋白质与 LZ-8 及免疫球蛋白的重链区的蛋白结构有相当程度的相似性, 在老鼠足趾肿胀实验中发现有抑制全身性过敏反应, 因此得知这类蛋白质具有免疫调节活性, 其调节机制为促进 IFN- $\gamma$ , IL-2 及 TNF- $\alpha$  基因的转录作用。(Ko J.L., *Eur. J. Biochem.* 1995; 228:224-249)。

面包酵母菌是最安全的食品微生物, 也是近代研究遗传、生理代谢及分子生物学的主要模式细胞。由于其安全性高于其它微生物, 除了传统运用于食品加工(如面包、酒类)外, 近年来面包酵母菌遗传工程系统已被成功应用于药用蛋白质的生产, 如水蛭素(Hirudin)、血红蛋白(Hemoglobin)、尿激酶(Urokinase)、人类血清蛋白(human serum albumin, HAS)、似胰岛素生长因子-1(insulin-like growth factor-1, IGF-I)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte macrophage colony stimulating factor, GM-CSF)、B型肝炎疫苗等(Romanos M.A. et al., *Yeast* 1992; 8: 423-488)。可依异源蛋白质的特性, 选择适当的宿主系统(食品及药品级蛋白质以面包酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 为主)。

在现阶段可以利用许多复杂的萃取方法从灵芝中获得灵芝免疫调节蛋白(美国专利第 5334704 号)。然而由于灵芝只长在自然环境中, 且多生长于高山的老树上, 因此灵芝的产量无法稳定提供大量高品质的灵芝免疫调节蛋白供研究使用。在本发明之前亦未曾有大量制备灵芝免疫调节蛋白的发明。

先前的研究(美国专利第 5334704 号)利用萃取纯化的方法生产灵芝免疫调节蛋白的产量并不好。若直接利用大肠杆菌生产, 则有内毒素(endotoxin)的问题, 必须花费高额经费来纯化, 从而造成成本的增加。利用哺乳类细胞生产所需成本甚高, 亦有病毒或朊毒体(prion)污染的危险。

在先前的研究中(美国专利第 5334704 号)公开了从灵芝(*Ganoderma*)分离的糖蛋白具有免疫调节活性。该发明指出, 此糖蛋白的制备可以直接培养灵芝(*Ganoderma*)菌丝(mycelia), 再从菌丝萃取并得到一水溶液, 自此萃取物纯化出该糖蛋白。因为糖蛋白纯度要求很高, 该专利的技术要用在工业的应用上是很困难。

## 发明内容

### 发明摘要

本发明提供一种核酸分子, 包含图 1(I) 所示的核酸序列。

本发明还提供表达载体及该载体转形的宿主细胞。

本发明另提供制备含灵芝免疫调节蛋白的宿主细胞的方法。

本发明另提供依此方法所制备的灵芝免疫调节蛋白。

本发明另提供含灵芝免疫调节蛋白的宿主细胞的用途。

本发明另提供由该表达载体所转形的宿主细胞纯化灵芝免疫调节蛋白的方法。

本发明另提供含本发明灵芝免疫调节蛋白的组合物。该组合物能应用于化妆品、医药品、食品及饲料添加物。

本发明另提供给个体口服灵芝免疫调节蛋白或与真菌免疫调节蛋白融合蛋白以调节免疫活性的方法。

#### 发明详述

由于面包酵母菌与灵芝同属真菌类，故酵母菌能较忠实地表达来自灵芝的异源蛋白质，包括蛋白质的生物活性及各种蛋白质修饰作用（如糖化作用，及双硫链的形成）。

本发明中灵芝免疫调节蛋白酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) 喜好密码子的 DNA 核酸序列 (SEQ ID NO: 1) 如下：

ATGTCTGATAC	TGCTTTGATT	TTCAGATTGG	CTTGGGATGT
TAAGAAGTTG	TCTTTCGATT	ACACTCCAAA	CTGGGGTAGA
GGTAACCCAA	ACAAC TTCAT	TGATACTGTT	ACTTTCCCAA
AGGTTTTGAC	TGATAAGGCT	TACACTTACA	GAGTTGCTGT
TTCTGGTAGA	AACTTGGGTG	TTAAGCCATC	TTACGCTGTT
GAATCTGATG	GTTCTCAAAA	GGTTAACTTC	TTGGAATACA
ACTCTGGTTA	CGGTATTGCT	GATACTAACA	CTATTCAAGT
TTTCGTTGTT	GATCCAGATA	CTAACAACGA	TTTCATTATTG
CTCAATGGA	ACTGA		

本发明提供的核酸分子能衔接一段胞外分泌的讯息序列，可以让宿主细胞生产的灵芝免疫调节蛋白直接分泌到细胞外的培养液中，从而使得纯化分离时可以降低成本。

本发明提供的核酸分子与其它基因的核酸分子连接形成一新的核酸序列。此新的核酸序列可以表现在一表现系统中。而由此新的核酸序列产生新的重组蛋白 (fusion protein) 不只具有灵芝免疫调节蛋白原有的免疫调节能力，也同时具备表现另一个基因的特性 (Weisbart RH, *Cancer Lett.* 2003;195(2):211-9.)。因为灵芝免疫调节蛋白在消化系统中仍保有生物活性，利用灵芝免疫调节蛋白与另一个蛋白质作为融合蛋白 (fusion protein)，灵芝免疫调节蛋白可以作为一种携带系统 (delivery system)，将另一个蛋白质

带到标的细胞产生该蛋白的生物活性。此外口服该融合蛋白，也能使组成融合蛋白质的蛋白质皆发挥其功能。

本发明提供一载体，该载体包含本发明的核酸分子。此载体可以转形至宿主细胞。视应用于不同状况及用途，该载体可以是环状(circular)或嵌入(integrated)的质粒。

本发明提供被上述表达载体转形的宿主细胞。此宿主细胞可以是细菌、真菌细胞或酵母菌细胞。此宿主细胞可以是完整的或打破的细胞形式。

此宿主细胞可以是面包酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)、巴氏毕赤酵母(*Pichia pastoris*)、汉逊酵母(*Hansenula polymorpha*)、产朊假丝酵母(*Candida utilis*)、博伊丁假丝酵母(*Candida boidinii*)、麦芽糖念珠菌(*Candida maltosa*)、乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*)、解脂酵母(*Yarrowia lipolytica*)、西方酵母(*Schwanniomyces occidentalis*)、粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)、球拟酵母属(*Torulopsis*)、(*Arxula adeninivorans*)，或曲霉属(*Aspergillus*) (构巢曲霉(*A. nidulans*)，黑曲霉(*A. niger*)，泡盛曲霉(*A. awamori*)，米曲菌(*A. oryzae*))，木霉(*Trichoderma*) (里氏木霉(*T. reesei*))。植物细胞也可当作是一种宿主细胞。

本发明提供一个制备含灵芝免疫调节蛋白宿主细胞的方法。此方法包括(a)构筑一个含改良后灵芝免疫调节蛋白基因序列的表达载体，(b)利用此表达载体转形到一个宿主细胞内，(c)使用适当的培养方法，使宿主细胞可以表达产生蛋白质。本发明所指蛋白质序列在图3。本发明所指宿主细胞可为面包酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)，巴氏毕赤酵母(*Pichia pastoris*)，汉逊酵母(*Hansenula polymorpha*)，产朊假丝酵母(*Candida utilis*)，博伊丁假丝酵母(*Candida boidinii*)，麦芽糖念珠菌(*Candida maltosa*)，乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*)，解脂酵母(*Yarrowia lipolytica*)，西方酵母(*Schwanniomyces occidentalis*)，粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)，球拟酵母属(*Torulopsis*)，(*Arxula adeninivorans*)，或曲霉属(*Aspergillus*) (构巢曲霉(*A. nidulans*)，黑曲霉(*A. niger*)，泡盛曲霉(*A. awamori*)，米曲菌(*A. oryzae*))，木霉(*Trichoderma*) (里氏木霉(*T. reesei*))。植物细胞也可当作是一种宿主细胞。在步骤b与c中，最适的宿主细胞为面包酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)。在(b)所指的表达载体为 pYB101FIP-yeast 或 pYB101FIP-1z(图4(II)及图4(III))。所指具体的表达蛋白质真菌喜好密码子的核酸序列说明见图1(I)，为面包酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) 喜好的密码子的DNA核酸序列。真菌喜好密码子的核酸序列是取决于其在转译(translation)时 tRNA 转译的速率(Sorensen MA, Pedersen S. *J Mol Biol.* 1991; 222(2):265-80)。



本发明提供含灵芝免疫调节蛋白宿主细胞的应用。例如包含有灵芝免疫调节蛋白完整细胞的酵母菌，可以直接以口服方式施用并可以在生物体中发挥生物活性，不用任何纯化的步骤，从而减少生产上的成本。

本发明提供一种从转形的宿主细胞中纯化出灵芝免疫调节蛋白的方法。此方法包含(a)将发酵后的细胞溶于一溶剂中；(b)打破细胞；(c)调整 pH 值到 4-5 之间；(d) 去除细胞破片；(e)上清液离心去除大的杂质；(f)将上清液加入已经平衡好 pH 值(4-5)的管柱中；(g)析出灵芝免疫调节蛋白。其中纯化步骤中的(a)用 5-50 mM 磷酸盐缓冲液(phosphate buffer) pH 7.0, 以 1:5-1:20 比例加入发酵后的细胞；(b)以破菌机进行破菌；(c) 调整 pH 值到 4-5 之间；(d) 3,000xg 离心 15 分钟，去除细胞破片；(e) 12,000xg 离心 1 分钟，去除大的杂质；(f)将上清液加入已平衡 pH 值为 4-5 的 CM Sepharose 管柱中(Amersham Biosciences)；(g)以 20-50mM pH4-5 的醋酸析出灵芝免疫调节蛋白。

本发明也提供由此方法制备的灵芝免疫调节蛋白。

本发明提供有关纯化的灵芝免疫调节蛋白或含灵芝免疫调节蛋白宿主细胞的服用途径。服用方式可以用静脉注射、腹腔注射、肌肉注射、口服、经黏膜层吸收、皮肤接触吸收或以浸泡于液体中的形式或其它可应用的传递(delivery)路径。而其中以口服应用方式为优先考虑方法。应用在淡水或海水动物，如鱼类时，也可以浸泡在含有灵芝免疫调节蛋白的液体中，通过鳃吸附到鱼体内。

本发明提供的纯化的灵芝免疫调节蛋白或含灵芝免疫调节蛋白宿主细胞可以广泛使用于哺乳类、鱼类、甲壳类及畜产、家禽类。这里所指的哺乳类及家禽类为猪、鸡。所指鱼类是石斑鱼、鲑鱼、鳟鱼。所指甲壳类是虾、龙虾、草虾、斑节虾、白虾。

本发明提供口服包含本发明灵芝免疫调节蛋白组合物的应用而达到免疫调节的功能。此灵芝免疫调节蛋白可以从灵芝制备出来或由本发明所公开的方法而来。基于灵芝免疫调节蛋白的相关研究指出，在医药上使用可以减少发炎、降低及避免过敏反应、调节免疫力、预防糖尿病、改善气喘、抗病毒及细菌的感染及抗器官排斥。应用于食品或饲料的添加上，可以延长生命、增进免疫调节活性、饲料转换率以及降低紧迫所引起的免疫反应(Black PH, *Brain Behav Immun.* 2003 Oct;17(5):350-64.)。

本发明提供的灵芝免疫调节蛋白可以以直接口服的使用方式来调节免疫失调的疾病。灵芝免疫调节蛋白可以从大肠杆菌(*E. coli*) 或真菌例如面包酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*) 制备获得。

本发明提供一种免疫学试验，例如西方墨点法(Western blot)或酶联免疫吸附反应(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay(ELISA))用来检测中药(如灵芝)、食品、饮料、化妆品、饲料添加物、药物或其它含真菌免疫调节蛋白组合物的含量，作为各产品中真菌免

疫调节蛋白含量的检验基准。(Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., pp: 18.60-18.75.)。

包含本发明蛋白质的组合物会包含其它先前技术所知的所有剂型的添加物质, 这些添加物质包括适合口服使用的甜味剂(sweetener)、填充物(thickener)及调味物质(flavoring agent)等。

本发明组合物的适当剂量依照疾病的类型、严重程度及时期(stage)而定, 也因病人的差异而不同。确定适当的剂量一般须衡量本发明治疗所带来的好处与本发明治疗所产生的危险或对身体身心有害副作用的平衡。

#### 附图说明

图 1(I) 为本发明利用基因合成灵芝免疫调节蛋白的改良成面包酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) 所喜好的密码子, FIP-yeast;

图 1 (II) 为灵芝 (*Ganoderma lucidum*) 原有的密码子的基因序列, FIP-1z。

图 2 为本发明利用基因合成灵芝免疫调节蛋白基因, 其中图 2 (I) 为酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) 喜好的密码子所需的正向及反向引物, 图 2 (II) 为灵芝 (*Ganoderma lucidum*) 原有的密码子所需的正向及反向引物。

图 3 为灵芝 (*Ganoderma lucidum*), 松杉灵芝 (*Ganoderma tsugae*) 和 *Flammulina velutipes* 的氨基酸序列比较。粗体字表示三者相同的氨基酸。

图 4 为(I) pYB101(II) pYB101-FIP-yeast (III) pYB101-FIP-1z 三种质粒构筑图。

图 5 为酵母菌(DY150 或 BY4741)所表达灵芝免疫调节蛋白的含量。其中图 5 (I) 表示以 pYB101-FIP-yeast 表达载体进行转形; 图 5 (II) 表示以 pYB101-FIP-1z 表达载体进行转形。图中, M 表示蛋白质分子量标准品: 175, 83, 62, 47.5, 32.5, 25, 16.5 及 6.5 Kd。S 表示由转形的大肠杆菌所制备的灵芝免疫调节蛋白标准品。第 1-2 道表示 pYB101-FIP-yeast 表达载体所转形 DY150 酵母菌的两个转形株, 第 3-4 道表示 pYB101-FIP-yeast 表达载体所转形 BY4741 酵母菌的两个转形株, 第 5-6 道表示 pYB101-FIP-1z 表达载体所转形 BY4741 酵母菌的两个转形株, 第 7-8 道表示 pYB101-FIP-1z 表达载体所转形 DY150 酵母菌的两个转形株。

图 6 为胞外表达灵芝免疫调节蛋白的核酸序列及限制酶位置, 其中 (I) 为正向引物, (II) 为反向引物。

图 7 为 pYB101s 及 pYB101s-FIP 载体所包含的  $\alpha$ -因子领导序列的核酸序列及限制酶位置。限制酶位置以粗体字标示。 $\alpha$ -因子领导序列及灵芝免疫调节蛋白基因以箭头表示。

图 8 为 pYB101s 质粒(I)及 pYB101s-FIP 质粒(II)构筑图。

图 9 为 pYB101s-FIP 转形 BY4741 所胞外表达出来的灵芝免疫调节蛋白。其中, M 表示蛋白质分子量标准品: 175, 83, 62, 47.5, 32.5, 25, 16.5 及 6.5 Kd. S 表示由转形的大肠杆菌所制备的灵芝免疫调节蛋白标准品。第 1-3 道表示半乳糖诱导后第一、第二及第三天 pYB101s-FIP 转形 BY4741 的表达量。

图 10 为不同灵芝免疫调节蛋白制备下, 用不同浓度的蛋白质与人类周边血细胞(PBL)一起培养下, 人类周边血细胞产生 IFN- $\gamma$  的量。blank 表示 PBS 对照组。Batch1 表示第一次 50 升发酵产程破菌后的上清液。Batch2 表示第二次 50 升发酵产程破菌后的上清液。Yeast 表示一般市售酵母粉, 经破菌后的上清液。PHA 表示植物血凝素(phytohemagglutinin)。

图 11(I)为灵芝免疫调节蛋白在 ÄKTA™ explorer 10S system 的纯化分析图, F3、F4 及 F5 为第三、第四及第五管收集样品。

图 11(II) 通过 ÄKTA™ explorer 10S system 纯化出的灵芝免疫调节蛋白的 SDS-PAGE 电泳图。M 表示蛋白质分子量标准品: 175, 83, 62, 47.5, 32.5, 25, 16.5 及 6.5 Kd. STD 表示由转形的大肠杆菌所制备的灵芝免疫调节蛋白标准品。F3、F4 及 F5 为第三、第四及第五管收集样品。

图 12 为含灵芝免疫调节蛋白的酵母菌进行 50L 发酵槽发酵, 以西方墨点法检测灵芝免疫调节蛋白的产量结果。M 表示蛋白质分子量标准品; S 表示由大肠杆菌生产的灵芝免疫调节蛋白质纯化标准品。

图 13 为不同浓度纯化的灵芝免疫调节蛋白对石斑鱼头肾细胞的 NBT 分析结果。Cont 表示 PBS 对照组。

图 14 为腹腔注射不同浓度灵芝免疫调节蛋白于石斑鱼腹腔内, 再将石斑鱼感染红彩病毒观察其死亡率。PBS 表示注射病毒前腹腔注射 0.1 ml 的 PBS, 0.25  $\mu$ g/0.1ml 表示注射病毒前腹腔注射 0.25  $\mu$ g/0.1ml 的纯化灵芝免疫调节蛋白, 1  $\mu$ g/0.1ml 表示注射病毒前腹腔注射 1  $\mu$ g/0.1ml 的纯化灵芝免疫调节蛋白, 5  $\mu$ g/0.1ml 表示注射病毒前腹腔注射 5  $\mu$ g/0.1ml 的纯化灵芝免疫调节蛋白。

图 15 为喂食石斑幼鱼含灵芝免疫调节蛋白的酵母菌后, 将石斑幼鱼感染弧菌, 观察石斑幼鱼的存活率。PBS 表示磷酸盐缓冲剂对照组。20mg、4mg、0.8mg 表示弧菌接种前给石斑鱼喂食上述剂量含灵芝免疫调节蛋白的酵母菌。Control 表示给石斑鱼喂食 20mg 一般市售酵母菌。



图 16 为将 *Der p* 处理过已致敏过的 Balb/c 小鼠，取出该小鼠脾脏细胞，再利用灵芝免疫调节蛋白或 *Der p* 萃取物来再次刺激，观察脾脏细胞其 IFN- $\gamma$  的产量。FIP-gts 表示灵芝免疫调节蛋白。*Der p* 表示尘螨过敏原 (der p 2)。Control 表示 PBS 对照组。

### 具体实施方式

下面结合具体实施例对本发明作进一步阐述，但不限制本发明。

实施例一：pYB101-FIP-yeast 和 pYB101-FIP-LZ 表达载体的制备

#### 1. FIP-yeast 和 FIP-lz 的 DNA 和引物核酸序列的制备：

参照已知方法 (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1991 May 15; 88 (10): 4084 - 4088)，以基因合成的方式来合成不同密码子喜好的灵芝免疫调节蛋白 DNA 核酸序列，如图 1 (I) 为面包酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 喜好的密码子的 DNA 序列 FIP-yeast；图 1 (II) 为灵芝 (*Ganoderma lucidum*) 原始密码子的 DNA 序列 FIP-lz。依据已知方法 (*J. Biol. Chem.* 266 (4), 2486-2493 (1991))，利用已知的灵芝免疫调节蛋白基因序列，分别设计出不同密码子喜好的核酸序列，并依照这两种不同密码子喜好的核酸序列，订购所需的 DNA 正向引物及反向引物 (Mission biotech, Taiwan)，并在基因两侧设计要接入表达载体的限制酶切割位 DNA 序列 (*Pml*I and *Bam*HI) 的引物，见图 2 (I) 和 图 2 (II)，而后进行 DNA 聚合酶链反应 (polymerase chain reaction)，最后经定序 (Mission biotech Co., Ltd., Taiwan) 确定，便完成两种不同喜好密码子的灵芝免疫调节蛋白的基因合成。

#### 2. pYB101, pYB101-FIP-yeast 和 pYB101-FIP-LZ 质粒的构筑：

如图 4 所示，将半乳糖启动子 (galactose promoter)、营养缺陷筛选基因 Ura3 及 2  $\mu$  ori 酵母菌的增殖起点 (replication origin) 加入 pYB 质粒中 (Yeastern Biotech Co., Ltd, Taiwan) 即完成 pYB101 (I)。并可以被转形应用于一般面包酵母 (例如：BY4741 或 DY150)。

表达载体 pYB101 及上述合成好的不同喜好密码子的基因片段各以适当 DNA 限制酶 (*Bam* HI 和 *Pml* I, New England Biolabs, USA) 一起作用。各将经限制酶作用过后的 DNA 溶液，经过纯化 DNA 管柱 (PCR Cleaning Up Purification Kit, Viogene, Taiwan) 纯化出两种不同喜好密码子合成的灵芝免疫调节蛋白基因 DNA 及表达载体 DNA。再将 DNA 浓度调成分子摩尔数比为 3:1 (合成基因:载体)，经 T<sub>4</sub> DNA 连接酶 (New England Biolabs, Beverly, USA) 进行灵芝免疫调节蛋白 DNA 及酵母菌表达载体 DNA 的连接 (ligation)。分别命名为 pYB101-FIP-yeast (酵母菌喜好的密码子，(II)) 及 pYB101-FIP-LZ (灵芝原始密码子，(III))。

#### 3. pYB101-FIP-yeast 或 pYB101-FIP-LZ 转形至大肠杆菌中：

参照已知方法 (*Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2nd Ed.* , , pp:1.82-1.84)



分别将 pYB101-FIP-yeast 或 pYB101-FIP-LZ 转形至大肠杆菌 DH5  $\alpha$  中。使用市售 DNA 萃取试剂(Mini-M Plasmid DNA Extraction Kit, Viogene, Taiwan), 可由转形至大肠杆菌中得到大量 pYB101-FIP-yeast 及 pYB101-FIP-LZ。

#### 实施例二：小量生产 FIP-yeast 及 FIP-LZ

1. 分别将 pYB101-FIP-yeast 和 pYB101-FIP-LZ 表达载体 DNA 转形至面包酵母 (BY4741 或 DY150) 中：

将实施例一所获得的两种不同喜好密码子的灵芝免疫调节蛋白表达载体 DNA (pYB101-FIP-yeast 与 pYB101-FIP-lz) 各 1  $\mu$ g 及面包酵母 (BY4741 或 DY150) 与酵母菌转形试剂一起作用 (Yeast Transformation Kit, Yeastern Biotech Co., Ltd., Taiwan)。

2. 利用营养需求筛选正确的转形面包酵母菌株：

根据 BY4741 及 DY150 营养缺陷上的特性 (BY4741: MATa his3delta1 leu2delta0 met15delta0 ura3delta0. DY150: MATa ura3-52 leu2-3 112 trp1-1 his3-11 15 ade2-1 can1-100), 上述各个转形酵母菌平均涂抹在 YNBD 培养基上培养 (0.17% Bacto 不含氨基酸的酵母氮基 (Difco, England)、0.5% 硫酸铵、2% 葡萄糖, 2% 琼脂, (Sigma, USA))。因此分别在 YNBD 培养基上事先还需要加入 0.0024% 组氨酸、0.0072% 亮氨酸、0.0012% 蛋氨酸 (BY4741) 或 0.0072% 亮氨酸、0.0048% 色氨酸、0.0024% 组氨酸、0.0024% 腺嘌呤 (DY150) (Sigma, USA), 置于 30°C 培养箱中培养 2-3 天。因为尿嘧啶 (uracil) 并未添加在培养基中, 因此未转形带有上述表达载体的酵母菌株, 无法自行产生尿嘧啶 (uracil) 而会死亡。本试验利用营养需求筛选正确带有表达载体的转形面包酵母菌株。

3. 带有灵芝免疫调节蛋白转形面包酵母的小量摇瓶测试：

将上述利用营养需求筛选出正确的带有灵芝免疫调节蛋白转形面包酵母菌株, 各取两株菌, 点菌至 50ml 的 YNBD 培养液及缺陷株所需的相关药品 (实施例二：步骤 2) 中, 培养温度为 30°C, 250 rpm 的转速进行培养 3 天, 而后离心菌液, 用 YNB 培养液清洗三次去除葡萄糖, 再以 50ml 的 YNBG 培养液 (0.17% Bacto 不含氨基酸的酵母氮基、0.5% 硫酸铵、2% 半乳糖 (Sigma, USA)) 及缺陷株所需的相关药品 (实施例二：步骤 2), 将菌的浓度调成 0.1 OD<sub>600nm</sub>, 以培养温度为 30°C、250 rpm 的转速进行培养, 再利用分光光度计 (Spectrophotometer) (Ultrospec 2100 pro, Amersham pharmacia biotech, USA), 每日记录 OD<sub>600nm</sub> 并收集 1ml 酵母样品经过 10,000x rpm 离心 (Microfuge 18 Centrifug, Beckman Coulter, USA), 水洗三次后将酵母菌菌体保存在 -20°C 中。

实施例三：利用西方墨渍法 (Western Blot) 定量转形的面包酵母表达灵芝免疫调节蛋白质：

1. 将上述收集后的酵母菌样品以PBS(Sigma, USA)将菌体稀释成0.5 OD<sub>600nm</sub>, 溶于2x SDS 样品缓冲液 (sample buffer) (Sigma, USA)后, 100℃下加热三分钟, 冷却后每个稀释样品取10 μl 并以100伏特进行SDS-PAGE电泳, 待电泳至适当位置后即完成电泳 (*Nature* (1970) 227, 680-685)。

2. 西方墨渍法方式 (参考 *Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2nd Ed.*, pp:18.60-18.75): 将胶体上蛋白质转渍到PVDF膜 (Hybond-P, Amersham Bioscience, USA)上, 通入50mA电流直到蛋白质皆转渍到转渍试纸上, 再将转渍试纸取出, 加入阻断缓冲液 (blocking buffer) 以37℃作用一小时, 而后在4℃作用隔夜, 将阻断缓冲液倒掉, 加入10<sup>-4</sup>稀释兔子抗灵芝免疫调节蛋白血清 (Taiwan Advance Bio-Pharm Inc., Taiwan), 以37℃作用一小时后去上清液并经清洗缓冲液 (washing buffer) 洗过, 再加入10<sup>-4</sup>稀释含HRP标示的老鼠抗兔子血清的抗血清 (Sigma, USA), 以37℃作用一小时后去上清液并经清洗缓冲液洗过, 加入呈色液 TMB (sigma, USA), 待出现颜色即可用水终止呈色反应, 完成西方转渍法测试。结果见图5。

由图5 (I)及图5 (II)得知, M表示蛋白质分子量标准品, S表示由大肠杆菌生产的灵芝免疫调节蛋白质纯化标准品, 1-4群为改良灵芝免疫调节蛋白质的密码子所表达的灵芝免疫调节蛋白质。2-5群为原灵芝免疫调节蛋白质的密码子所表达的灵芝免疫调节蛋白质。如图5 (I)所示, 1-3群清楚可见灵芝免疫调节蛋白表达, 而5-8群无法侦测生灵芝免疫调节蛋白。此结果显示, 改良灵芝免疫调节蛋白质的密码子能在酵母菌中高度表达出来。

#### 实施例四: 构筑表达载体 pYB101s-FIP

##### 1. 构筑 FIP

根据实施例三的结果选择酵母菌喜好密码子的 FIP 核酸序列作为外泌生产基因的模板 (template), 并选择 BY4741 作为外泌生产的宿主细胞。

##### 2. 制备 FIP 引物

根据实施例三的结果及步骤选择酵母菌喜好密码子的 FIP 作为模板 DNA (序列见图 1 (I)), 依照此模板 DNA 设计并购买两端接入 pYB101s 表达载体 (Yeastern Biotech Co., Ltd. Taiwan) 的正向引物及反向引物 (图 6 (I 及 II)) (Mission Biotech Co., Ltd. Taiwan)。以酵母菌喜好密码子的 FIP 做为模板 DNA (pYB101-FIP-yeast), 及上述正向引物及反向引物利用 PCR 反应合成灵芝免疫调节蛋白基因的 DNA 片段。

##### 3. 构筑 pYB101s 及 pYB101s-FIP

将半乳糖启动子 (galactose promoter)、α-因子领导序列 (图 7)、营养缺陷筛选基因 Ura3 及 2μ ori 酵母菌的增殖起点 (replication origin) 加入 pYB 质粒中 (Yeastern Biotech Co., Ltd, Taiwan) 即完成 pYB101s (图 8 (I))。并可以被转形应用于一般面包酵

母(例如: BY4741)。

根据实施例一的步骤构筑 pYB101s-FIP 表达载体, 如图 8 所示。利用 DNA 定序确定整个基因序列(Mission Biotech Co., Ltd. Taiwan)。

#### 4. pYB101s-FIP 转形至大肠杆菌中

根据实施例一的步骤将 pYB101s-FIP 表达载体转形至 DH5  $\alpha$  中。抽取大量 pYB101s-FIP 表达载体的 DNA。

#### 实施例五: 制备小量灵芝免疫调节蛋白

##### 1. 将 pYB101s-FIP 转形至酵母菌 BY4741 中

根据实施例二的步骤将上述抽出的 pYB101s-FIP 表达载体 DNA 转形至烘焙酵母(Baker's Yeast) BY4741 中。

##### 2. 利用营养需求筛选正确的转形面包酵母菌株:

根据实施例二的步骤将上述含 pYB101s-FIP 表达载体的正确转形株从 YNBD 琼脂(含 0.0024% 组氨酸, 0.0072% 亮氨酸, 0.0012% 蛋氨酸)中挑出。

##### 3. 带有灵芝免疫调节蛋白转形面包酵母的小量摇瓶测试:

根据实施例二的步骤将上述含 pYB101s-FIP 表达载体的正确转形株接种至 50ml 的培养液中。利用半乳糖(galactose)诱导(induction)生产出外泌的灵芝免疫调节蛋白, 并且每日收集样品。

#### 实施例六: 利用 SDS-PAGE 法测试转形的面包酵母表达灵芝免疫调节蛋白质产量:

根据实施例二的步骤将上述收集的样品进行 SDS-PAGE。而后再将此 SDS-PAGE 利用考马斯亮蓝(Coomassie brilliant blue) G-250(sigma)进行染色 30 分钟, 用去染液(destain solution, 20% 甲醇, 10% 乙酸)退色至蛋白质带(protein band)清晰可见(见图 9)。

#### 实施例七: 50 升发酵产程

##### 1. 接种 50ml 锥形瓶培养:

上述实施例二中, 挑选经西方墨点法确定具有灵芝免疫调节蛋白产量的转形面包酵母一株(BY4741/pYB101-FIP-yeast)接种至 50ml 的 YNBD 培养基中, 加入各缺陷株所需的相关药品(实施例二: 步骤 2), 以 30°C、250rpm 转速培养 24 小时。

##### 2. 接种 500ml 锥形瓶培养:

将上述培养后的 50ml 菌液接种至同样的 450ml 的培养液中, 以 30°C、250rpm 转速培养 24 小时。

##### 3. 接种至 50 升发酵槽(Chuan Tai Factory, Taiwan)进行发酵:

将上述培养后的 500ml 菌液以利用离心方式, 并用 YNB 培养液清洗三次去除葡萄糖, 再以 50 升的 YNBG 培养液 (0.17% Bacto 不含胺基酸之酵母氮基, 0.5% 硫酸铵, 2% 半乳



糖(Sigma, USA)) 及缺陷株所需的相关药品(实施例二:步骤2),将菌的浓度调成 0.1 OD<sub>600nm</sub> 以培养温度为 25-30℃、400-500 rpm 转速、pH 4.5-5.5(由 2M NaOH 及 HCl(Sigma, USA) 来调节酸碱)、槽内压力 0.2-0.4kg/cm<sup>2</sup>, 经 0.2 μm 过滤空气通气量为 40-50L/min 的条件进行发酵 3 天。

#### 4. 灵芝免疫调节蛋白 50 升发酵槽产程的产量测定:

取样的菌液利用上述实施例三, 以西方墨点法的方法测定灵芝免疫调节蛋白的产量。结果见图 1 2。由图 1 2 得知, 50 升发酵后的产物含有灵芝免疫调节蛋白。

#### 实施例八: 转形面包酵母表达灵芝免疫调节蛋白质的活性测试

##### 1. 全部细胞萃取物的制备:

玻璃珠(glass bead)磨菌方法: 培养后采集的酵母菌样品, 经离心, 用 PBS 清洗已收获酵母菌团块, 离心三次。收集酵母菌丸粒, 加入与 pellet 等体积的 0.4mm 玻璃珠。在 4℃ 下震动混合物 20 秒且冰浴 1 分钟。重复此步骤五次。在 4℃ 15000rpm 离心五分钟后, 用上清液当作全部细胞萃取物。离心检体, 留置上清液。用 0.2um 膜(Sartorius) 过滤上清液且留置备用。

##### 2. 人类周边血单核球细胞制备:

利用成人已加肝素防止凝固(heparinized)的周边血液加入 Ficoll-paque 培养液(Amersham Biosciences)离心分离出人类周边血单核球细胞。1 X 10<sup>6</sup> cells/ml 的细胞培养在含有 10 % FBS、100 μg/ml 链霉素、100 units/ml 青霉素及 200 mM L-谷氨酸钠(L-glutamate)的 RPMI1640 培养基(GIBCO, Grand Island, NY)的 24-孔组织培养盘(Nunc, Roskilde, Denmark)中。以 37℃ 培养 0、24 或 48 小时。

##### 3. 细胞激素(cytokine)的测定:

上述 1 X 10<sup>6</sup> cells/ml 的细胞培养在 24-孔组织培养盘(Nunc, Roskilde, Denmark), 加入上述萃取出不同浓度的灵芝免疫调节蛋白共同培养。IFN-γ 活性是用商品试剂组(R&D Systems, Minneapolis, MN)来检测。结果见图 1 0, 由图 1 0 得知 PHA(phytohaemagglutinin, Sigma)在此 IFN-γ ELISA 测试中作为标准品使用(*The Journal of Immunology*, 1998, 161: 2114-2119)。第 1 批及第 2 批代表第一次 50 升发酵样品及第二次 50 升发酵样品, 使用不同剂量下产生的 IFN-γ 量。对照组及一般酵母组不会刺激生成 IFN-γ 量。纯化后灵芝免疫调节蛋白不同剂量也会产生的 IFN-γ 量。其中 4 μg 浓度的纯化后灵芝免疫调节蛋白与其它方式产生的灵芝免疫调节蛋白比较, 培养 48 小时后得到较高的 IFN-γ 含量。另外也显示 50 升发酵样品会刺激 IFN-γ 含量, 代表本发明所产生的 FIP 具有生物活性, 而并非因为酵母菌的关系。

#### 实施例九: 50L 发酵产程灵芝免疫调节蛋白的纯化

1. 发酵后酵母菌须以 20 mM 磷酸盐缓冲液 (Sigma) pH 6.0 回溶成 10%菌液, pH 值由 1M 醋酸调整。再利用破菌机(Basic Z model, Constant System Ltd. UK)以 30Kpsi 的压力打破细胞, 再调整至 pH 4-5。

2. 以 3,000 xg 离心 15 min, 取上清液, 再以 12,000 xg 离心 1 min。

3. 取 10 mL 的上清液注入 30 mL 的 CM 琼脂凝胶(AmershamBiosciences)(已先用 20-50 mM 醋酸平衡, 使周围的酸度维持 pH 4-5)的管柱中。

4. 以 20-50 mM pH4-5 醋酸, 流洗两倍管柱体积, 收取流出液, 即得到灵芝酵母蛋白。

5. 分析图见图 1 1 (I), F3、F4 及 F5 表示第 3、第 4 及第 5 个收集管样品, 第 3 及第 4 个收集管样品明显有较高的 mAU 值, 因此收集第 3、4 及第 5 个收集管样品, 并且进行 SDS-PAGE。结果见图 1 1 (II), M 表示蛋白质分子量标准品, STD 表示由大肠杆菌生产的灵芝免疫调节蛋白质纯化标准品, 由图 1 1 (II) 得知第 3、4 收集管样品与标准品有相同的分子量, 并且其纯度相当高。并且后续利用西方墨点法却认为 FIP。

#### 实施例十:灵芝免疫调节蛋白的应用

##### 1. 饲料添加物

##### A. 灵芝蛋白对石斑鱼的毒性试验:

鱼种为花鬼斑 (*Epinephelus malabaricus*), 购自高雄茄定地区的私人养殖场。平均体长为 7.25cm、平均体重为 5.9g。蓄养在海水盐度 33 ppt、水温 25℃的环境中。

取由实施例九纯化的灵芝免疫调节蛋白溶液, 分别以 5、1、0.25  $\mu$ g/尾 /0.1ml 的浓度腹腔注射入石斑鱼苗, 另外注射 PBS 溶液作为对照组。以原饲养环境流水饲养 14 天。每天观察并记录死亡情形。两周后所有组别皆没有死亡发生, 显示实验所选用的灵芝免疫调节蛋白浓度对石斑鱼并不会导致毒性反应。

##### B. 灵芝免疫调节蛋白对体外石斑鱼头肾细胞非特异免疫的影响:

由市场购入约 600g 石斑鱼, 取头肾、分离吞噬细胞并以 AL-10 培养液(L15(Gibco): AIM5(Gibco) =1:1 混合)悬浮, 种入 0.1 ml 的  $1 \times 10^7$ /ml 细胞在 96 孔培养盘(Corning), 静置吸附 2 小时。鱼的头肾细胞是鱼类非专一性免疫的主要细胞 (Engelsma MY, *Fish Shellfish Immunol.* 2003 Nov;15(5):397-410)。加入 2、1、0.5、0.2、0.02  $\mu$ g/0.1ml 由实施例九纯化的灵芝免疫调节蛋白溶液, 于室温作用 2 小时。进行 NBT 分析套组(Sigma): 根据 NBT 分析套组可得知添加灵芝免疫调节蛋白后, 石斑鱼头肾细胞的吞噬作用反应。

结果见图 1 3。由图 1 3 得知, 添加 2、1 和 0.5  $\mu$ g/0.1ml 由实施例九纯化的灵芝免疫调节蛋白, 可增加头肾细胞的吞噬作用。由此推知灵芝免疫调节蛋白可增强石斑鱼的非特异性免疫反应。

##### C. 石斑鱼腹腔注射灵芝免疫调节蛋白两周后进行虹彩病毒(Iridovirus)攻击试验的

预备试验:

对前述毒性试验的鱼进行腹腔注射 PBS 或灵芝免疫调节蛋白两周后,以腹腔注射方式注射 0.1ml 的 10,000XTCID<sub>50</sub> 病毒剂量,每日观察鱼死亡率。一般,经腹腔注射虹彩病毒的石斑鱼两周内死亡。由图 1 4 得知,以最高剂量 5 μg FIP/0.1 显示两周后有 70%死亡率,因此,两周内达到 30%保护率。

D. 对哈氏弧菌 (*Vibrio harvey*) 的保护率

a. 测试鱼种为石斑鱼 (*Epinephelus malabaricus*), 平均体重为 52.9 克。喂食石斑鱼 20mg、4mg 及 0.8 mg /60g 三种不同浓度的含灵芝免疫调节蛋白的酵母菌与对照一般酵母菌组 20 mg/60g 石斑鱼及 PBS 对照组,共五组,进行喂食,每组 20 尾石斑鱼,每两天喂食一次,连续喂食七天后,进行攻毒试验。

b. 以 10XLD<sub>50</sub> (3X10<sup>6</sup>CFU/ml) 的哈氏弧菌 (*Vibrio harvey*) 进行攻毒试验,以求其保护力。攻毒前先行采集血液,每组 10 尾,进行测试鱼的非特异性免疫反应包括 Lysozyme 活性、吞噬能力 (Phagocytosis) 及 NBT 阳性细胞数量三项,其它 10 尾进行攻毒细菌试验。每日观察记录鱼的活力、食欲及死亡率。

c. 结果见图 1 5,经由弧菌感染后的鱼,五天后,喂食一般酵母菌的鱼的存活率只有 10-20%,喂食含灵芝免疫调节蛋白的酵母菌的鱼的则其存活率有 60%-80%,并且死亡时间会延后。此结果指出口服含灵芝免疫调节蛋白酵母菌增强鱼类免疫力及延长鱼类生命。

实施例十一: 将 *Der p* 处理过已致敏过的 Balb/c 小鼠,取出该小鼠脾脏细胞,再利用灵芝免疫调节蛋白或 *Der p* 萃取物来再次刺激,观察脾脏细胞的 IFN- $\gamma$  的产量。

致敏实验的步骤:

a. 喂食灵芝免疫调节蛋白组的小鼠: 两天喂食一次 (2 μg) 直到第 15 天杀死 Balb/c 小鼠,取出脾脏细胞 (spleen cell)。

b. *Der P* 处理的小鼠: 第一天进行腹腔注射 10 μg, 隔七天再进行腹腔注射 10 μg, 再隔 7 天进行喷雾一次 10 μg, 第 15 天杀死 Balb/c 小鼠,取出脾脏细胞。

c. 脾脏细胞处理: 上述分离出的脾脏细胞,培养 1 X 10<sup>6</sup> cells/ml 在 RPMI 1640 含 5% FBS 的培养基中,然后再以 10 μg/ml *Der P* 或 2 μg/ml FIP 处理。培养 48 小时后收集培养液并分析 IFN- $\gamma$  的含量。

结果见图 1 6, 其中 *Der p* 表示尘螨 (dust mite) 过敏原 *Der p* II; FIP-gts 表示灵芝免疫调节蛋白。结果显示长期喂食灵芝免疫调节蛋白给 Balb/c 小鼠,其脾脏细胞再经灵芝免疫调节蛋白刺激并不会增加产生 IFN- $\gamma$  (81.9 pg/ml)。而未喂食灵芝免疫调节蛋白的对照组中 Balb/c 小鼠的脾脏细胞再经灵芝免疫调节蛋白刺激会增加产生 IFN- $\gamma$  (463.8 pg/ml)。经过 *Der p* 致敏过的 Balb/c 小鼠,其脾脏细胞再经灵芝免疫调节蛋白刺激会增加



产生 IFN-r(1100.7 pg/ml)。这显示口服灵芝免疫调节蛋白可以免疫调节，特别是直接抑制过敏反应。

本发明所描述及实施例中显示足够的细节及结果证明其实施性及应用性。

## 权 利 要 求

1. 一种核酸分子，包含以下核酸序列，其能转译出灵芝免疫调节蛋白：

ATGTCTGATAC	TGCTTTGATT	TTCAGATTGG	CTTGGGATGT
TAAGAAGTTG	TCTTTCGATT	ACACTCCAAA	CTGGGGTAGA
GGTAACCCAA	ACAACTTCAT	TGATACTGTT	ACTTTCCCAA
AGGTTTTGAC	TGATAAGGCT	TACACTTACA	GAGTTGCTGT
TTCTGGTAGA	AACTTGGGTG	TTAAGCCATC	TTACGCTGTT
GAATCTGATG	GTTCTCAAAA	GGTTAACTTC	TTGGAATACA
ACTCTGGTTA	CGGTATTGCT	GATACTAACA	CTATTCAAGT
TTTCGTTGTT	GATCCAGATA	CTAACAACGA	TTTCATTATTG
CTCAATGGA	ACTGA		

2. 根据权利要求 1 所述的核酸分子，其特征在于在同一个携带系统中连接另一个基因的核酸分子。

3. 一种表达载体，其特征在于包括权利要求 1 所述的核酸分子。

4. 一种表达载体，其特征在于包括权利要求 2 所述的经连接核酸分子。

5. 一种宿主细胞，其特征在于由权利要求 2 所述的表达载体所转形。

6. 根据权利要求 5 所述的宿主细胞，其特征在于为细菌、真菌或酵母菌。

7. 根据权利要求 5 所述的宿主细胞，其特征在于为选自包括面包酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*)，巴氏毕赤酵母 (*Pichia pastoris*)，汉逊酵母 (*Hansenula polymorpha*)，产朊假丝酵母 (*Candida utilis*)，博伊丁假丝酵母 (*Candida boidinii*)，麦芽糖念珠菌 (*Candida maltosa*)，乳酸克鲁维酵母 (*Kluyveromyces lactis*)，解脂酵母 (*Yarrowia lipolytica*)，西方酵母 (*Schwanniomyces occidentalis*)，粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*)，球拟酵母属 (*Torulopsis*)，(*Arxula adeninivorans*)，曲霉属 (*Aspergillus*) (构巢曲霉 (*A. nidulans*)，黑曲霉 (*A. niger*)，泡盛曲霉 (*A. awamori*)，米曲菌 (*A. oryzae*))，木霉 (*Tricoderma*) (里氏木霉 (*T. reesei*)) 所组成的群组。

8. 根据权利要求 6 所述的宿主细胞，其特征在于酵母菌是面包酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*)。

9. 根据权利要求 5 所述的宿主细胞，其特征在于其存在形式为完整细胞或破菌细胞。

10. 根据权利要求 9 所述的宿主细胞, 其特征在于完整细胞可分泌灵芝免疫调节蛋白。

11. 根据权利要求 5 所述的宿主细胞, 其特征在于在选自哺乳类、鱼类、甲壳类及家禽类动物群组中施用。

12. 根据权利要求 11 所述的宿主细胞, 其特征在于其给予方式为静脉注射、腹腔注射、口服、黏膜吸附、皮肤吸附及液体浸泡。

13. 根据权利要求 12 所述的宿主细胞, 其特征在于其给予方式为口服。

14. 根据权利要求 11 所述的宿主细胞, 其特征在于哺乳类指猪, 家禽类指鸡。

15. 根据权利要求 11 所述的宿主细胞, 其特征在于鱼类指石斑鱼、鲑鱼或鳟鱼。

16. 根据权利要求 11 所述的宿主细胞, 其特征在于甲壳类指虾、龙虾、草虾、斑节虾、白虾。

17. 一种制备含灵芝免疫调节蛋白宿主细胞的方法, 其方法程序为(a)构筑一个表达载体, 该载体插入具有改良后真菌免疫调节蛋白核酸序列; (b)用此载体转形宿主细胞; (c)在表达的适当环境下, 培养宿主细胞。

18. 根据权利要求 17 所述的方法, 其特征在于改良后真菌免疫调节蛋白的核酸序列为权利要求 1 所示的核酸分子序列。

19. 根据权利要求 17 所述的方法, 其特征在于步骤(a)所指的真菌为面包酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)。

20. 根据权利要求 17 所述的方法, 其特征在于步骤(b)所指的载体为 pYB101-FIP-yeast。

21. 一种真菌免疫调节蛋白, 其特征在于根据权利要求 17 的方法制备, 及自宿主细胞分离。

22. 一种由转形灵芝免疫调节蛋白的核酸序列的宿主细胞中纯化灵芝免疫调节蛋白的方法, 包含:

- (a) 将发酵后的转形细胞溶于一溶剂中;
- (b) 打破细胞;
- (c) 调整 pH 值到 5-6 间;
- (d) 分出细胞萃取物中的破片;
- (e) 离心上清液;
- (f) 将上清液加入已经 pH 值 5-6 平衡好的管柱中;
- (g) 离析出灵芝免疫调节蛋白。



23. 根据权利要求 22 所述的方法,其特征在于灵芝免疫调节蛋白是由 20-50mM 醋酸 pH 4-5 所离析出。

24. 一种用口服方式来调节免疫活性的组合物,其特征在于包含真菌免疫调节蛋白。

25. 根据权利要求 24 所述的组合物,其特征在于真菌免疫调节蛋白是由天然灵芝或根据权利要求 22 所述的方法所制备。

26. 根据权利要求 24 所述的组合物,其特征在于应用于化妆用途以减低发炎及过敏反应。

27. 根据权利要求 24 所述的组合物,其特征在于应用于药品用来减低发炎与过敏反应、调节免疫活性、预防糖尿病、改善气喘、增加抗菌能力、增加抗病毒能力及降低器官转移的排斥反应。

28. 根据权利要求 24 所述的组合物,其特征在于应用于食物或饲料添加,用以延长寿命、增加免疫反应、饲料转换率及减低紧迫症。

29. 一种调节免疫活性的方法,其特征包括口服给予真菌免疫调节蛋白或真菌免疫调节蛋白与另一种蛋白质融合至个体。

30. 根据权利要求 29 所述的方法,其特征在于蛋白质由大肠杆菌 (*E. coli*) 或面包酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 所制备。

FIP-yeast (面包酵母菌密码子)的 DNA 序列:

ATGTCTGATAC	TGCTTTGATT	TTCAGATTGG	CTTGGGATGT
TAAGAAGTTG	TCTTTCGATT	ACACTCCAAA	CTGGGGTAGA
GGTAACCCAA	ACAAC TTCAT	TGATACTGTT	ACTTTC CCAA
AGGTTTTGAC	TGATAAGGCT	TACACTTACA	GAGTTGCTGT
TTCTGGTAGA	AACTTGGGTG	TTAAGCCATC	TTACGCTGTT
GAATCTGATG	GTTCTCAAAA	GGTTAACTTC	TTGGAATACA
ACTCTGGTTA	CGGTATTGCT	GATACTAACA	CTATTCAAGT
TTTCGTTGTT	GATCCAGATA	CTAACAACGA	TTTCATTATTG
CTCAATGGA	ACTGA		

图1 (I)

I. FIP-lz (灵芝密码子)的 DNA 序列:

ATGTCCGACACT	GCCTTGATCT	TCAGGCTCGC	CTGGGACGTG
AAGAAGCTCT	CGTTCGACTA	CACCCCGAAC	TGGGGCCGCG
GCAACCCCAA	CAACTTCATC	GACACTGTCA	CCTTCCCGAA
AGTCTTGACC	GACAAGGCGT	ACACGTACCG	CGTCGCCGTC
TCCGGACGGA	ACCTCGGCGT	GAAACCCTCG	TACGCGGTCTG
AGAGCGACGG	CTCGCAGAAG	GTCAACTTCC	TCGAGTACAA
CTCCGGGTAT	GGCATAGCGG	ACACGAACAC	GATCCAGGTG
TTTCGTTGTCG	ACCCCGACAC	CAACAACGAC	TTTCATCATCG
CCCAGTGGA	ACTAG		

图 1 (II)

## FIP-yeast (面包酵母菌密码子)引物序列:

## i. 正向引物

AAAAAAAAAA GGATCCCGCA ATGTCTGATA CTGCTTTGAT

*Bam*HI

ATGTCTGATA CTGCTTTGAT TTTCAGATTG GCTTGGGATG TTAAGAAGTT GTCTTTCGAT AGGTAACCCA AACAACTTC  
TTGATACTGT TACTTTCCCA AAGGTTTTGA CTGATAAGGC TTTCTGGTAG AAACCTGGGT GTTAAGCCAT CTTACGCTG  
TGAATCTGAT GGTTCTCAA AACTCTGGTT ACGGTATTGC TGATACTAAC ACTATTCAAG TTTTCGTTGT TGATCCAGAT

## ii. 反向引物

AAAAAAAAAA CACGTG TCAA CTAGTTAGTT CCATTGAGCA

*Pml*II

CTAGTTAGTT CCATTGAGCA ATAATGAAAT CGTTGTTAGT ATCTGGATCA ACAACGAAA GCAATACCGT AACCAAGATT  
GTATTCCAAG AAGTTAACCT TTGAGAACC ATCAGATTCA ACCCAAGTTT CTACCAGAAA CAGCAACTCT GTAAGTGTA  
GCCTTATCAG TCAAAACCTT TGAAGTTGTT TGGGTACCT CTACCCAGT TTGGAGTGTA ATCGAAAGAC AACTTCTTA

图 2(I)

## FIP-lz (灵芝密码子)引子序列:

## iii. 正向引物

AAAAAAAAAA GGATCCCGCA ATGTCCGACA CTGCCTTGATC

*Bam*HI

ATGTCCGACA CTGCCTTGAT TTCAGGCTCG CCTGGGACGT GAAGAAGCTC TCGTTCGACT GGCAACCCCA ACAACTTCAT  
CGACACTGTC ACCTTCCCGA AAGTCTTGAC CGACAAGGCG CTCCGGACGG AACCTCGGCG TGAAACCCTC GTACGCGGTC  
GAGAGCGACG GCTCGCAGAA ACTCCGGGTA TGGCATAGCG GACACGAACA CGATCCAGGT GTTCGTTGTC GACCCCGACA

## iv. 反向引物

AAAAAAAAAA CACGTGTCAA CTAGTTAGTT CCCTAGTTCCA

*Pml*II

CTAGTTAGTT CCCTAGTTCC ACTGGGCGAT GATGAAGTCG TTGTTGGTGT CGGGGTCGAC ACGTGTCCGC TATGCCATAC  
CCGGAGTTGT ACTCGAGGAA GTTGACCTTC TCGAGCCGT CGTTTCACGC CGAGGTTCCG TCCGGAGACG GCGACGCGGT  
ACGTGTACGC CTTGTCGGTC AGTGTGATG AAGTTGTTGG GGTTGCCGCG GCCCAGTTC GGGGTGTAGT CGAACGAGAG  
C

图 2(II)



灵芝	MSDTAL I FRL AWDVKKLSFD YTPNWGRGNP
松杉灵芝	MSDTAL I FRL AWDVKKLSFD YTPNWGRGNP
<i>Flamnulina velutips</i>	SATSLT FQL A YLVKKI DFD YTPNWGRGTP
灵芝	NNFIDTVTFP KVLTDKAYTY R VAVSGRNLG
松杉灵芝	NNFIDTVTFP KVLTDKAYTY R VAVSGRNLG
<i>Flamnulina velutips</i>	SSYIDNLTFP KVLTDKKYSY R VVNGSDLG
灵芝	VKPSYAVESD GSQKVN FLEY NSGYG I ADTN
松杉灵芝	VKPSYAVESD GSQKVN FLEY NSGYG I ADTN
<i>Flamnulina velutips</i>	VESNFAVTPS GGQTI NFLQY NKG YGVADTK
灵芝	TIQVFVDPD TN NDF IIAQWN
松杉灵芝	TIQVFVDPD TN NDF IIAQWN
<i>Flamnulina velutips</i>	TIQVFVV I PD TGNSEEYIIAEWKKT

图 3

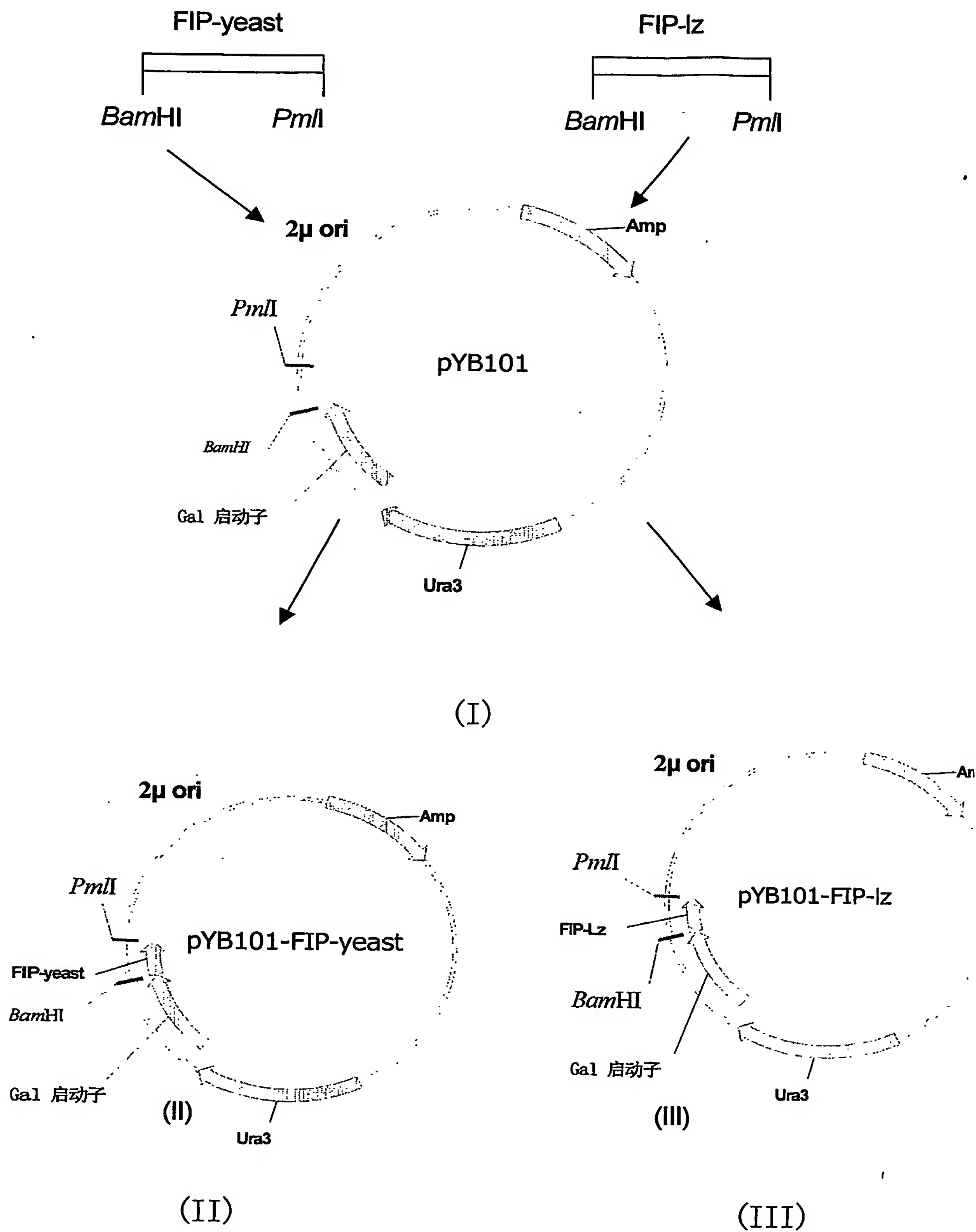


图 4

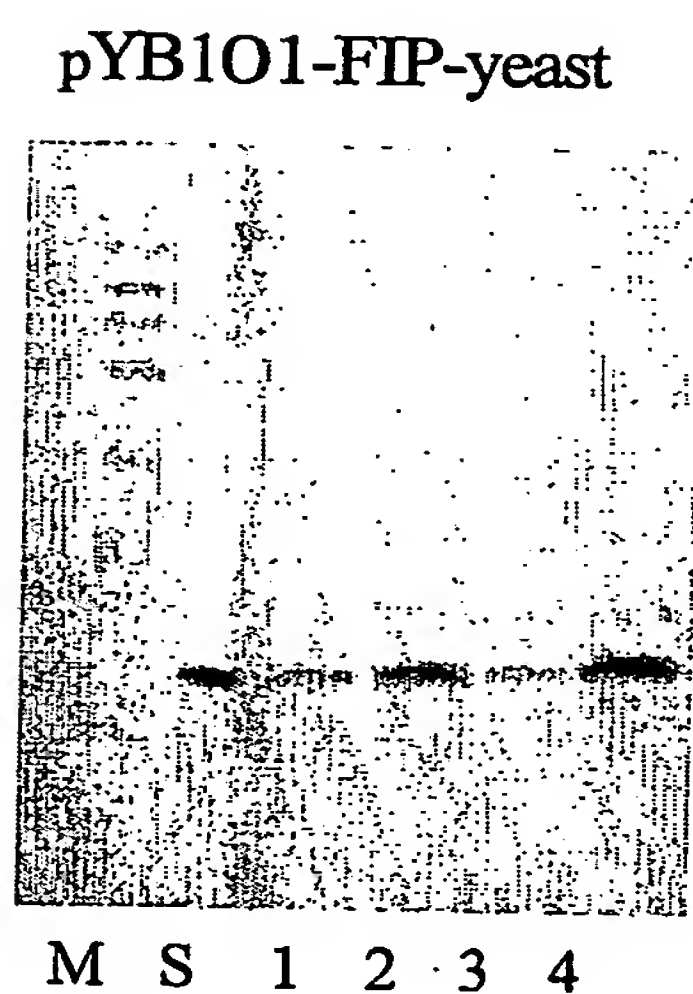


图 5(I)

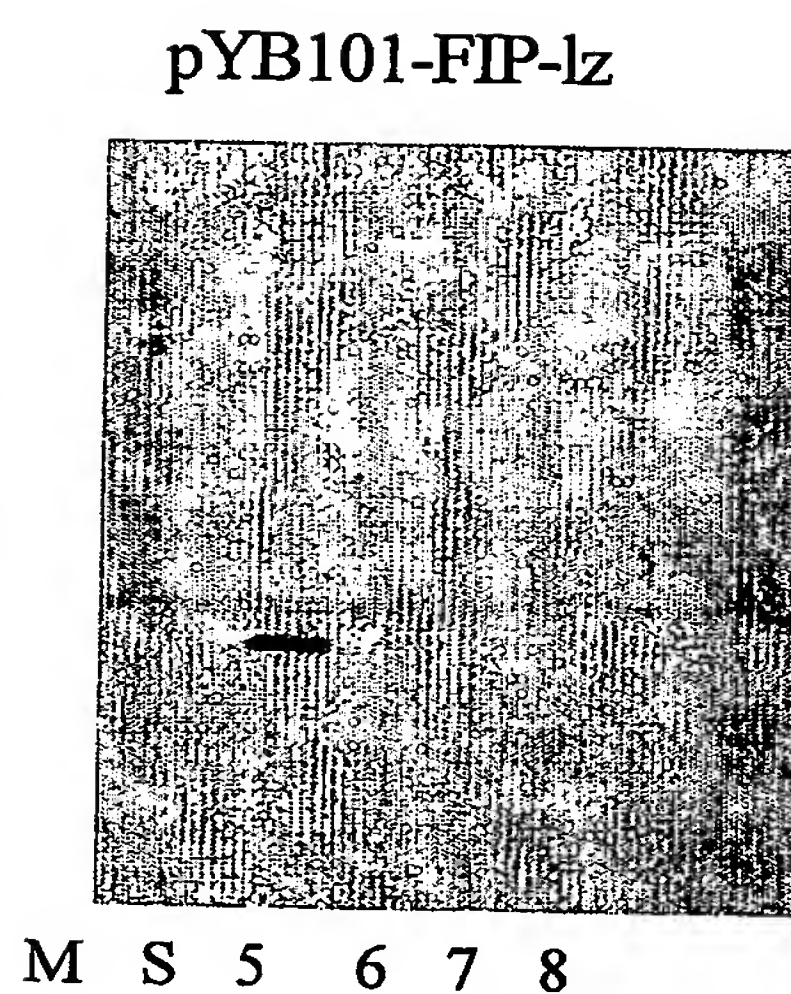


图 5(II)

## (I) 正向引物

AAAAACTCGA GAAAAGAGAG GCTGAAGCTA TGTCCGACAC TGCCTTGAT

*XhoI*

## (II) 反向引物

AAAAACACGT GTCAACTAGT TAGTTCCATT G

*PmlI*

图 6



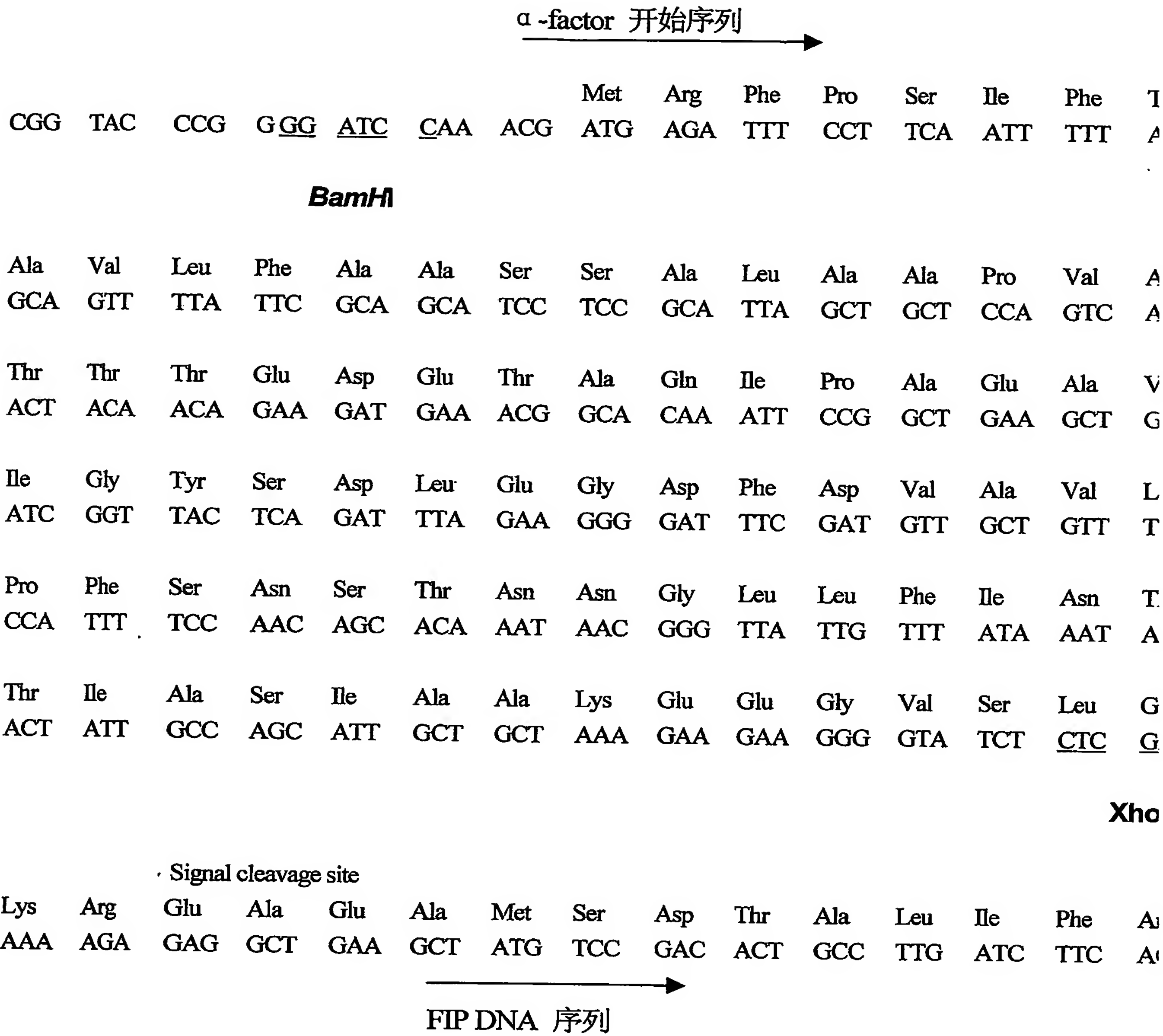


图 7

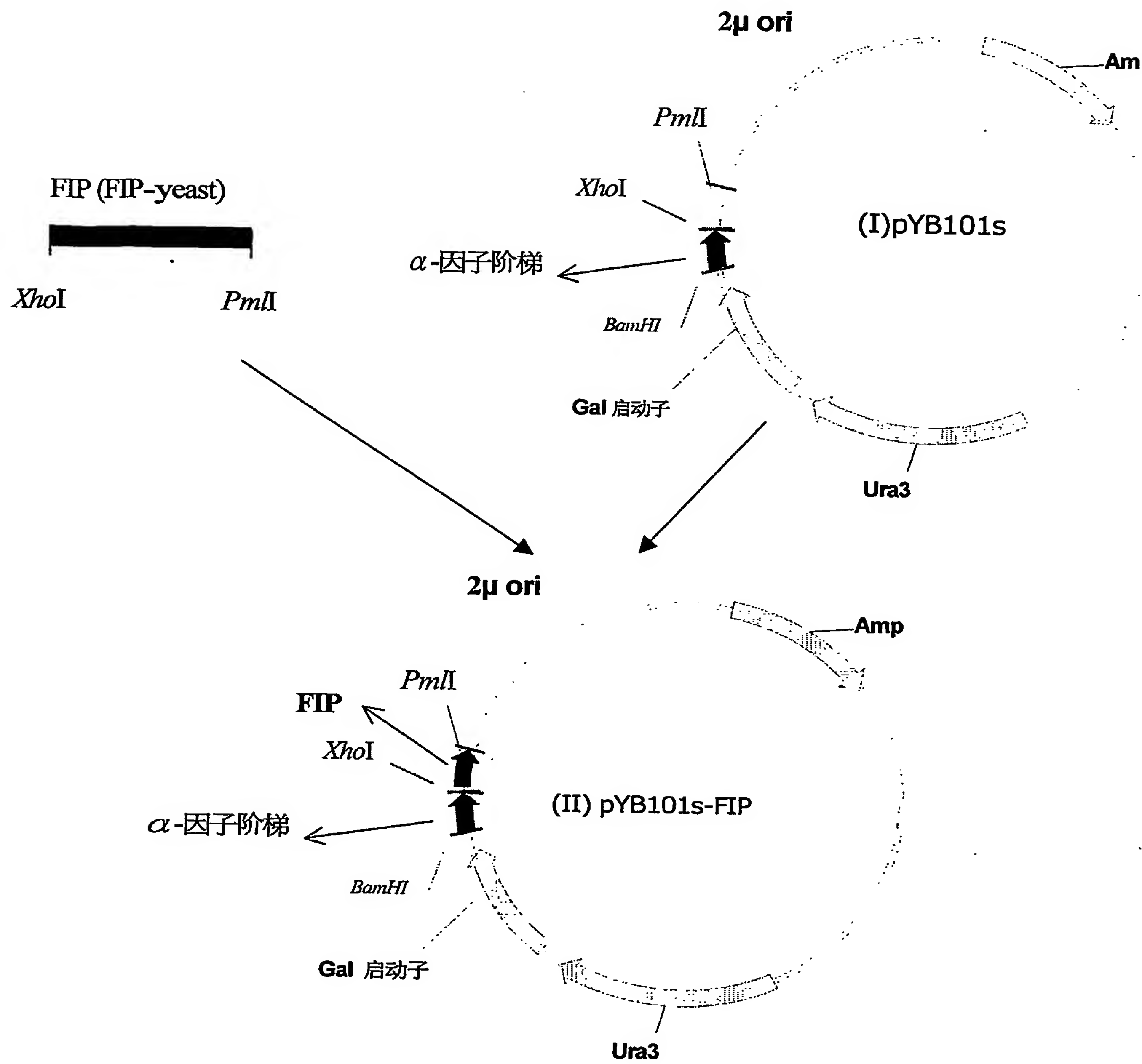


图 8

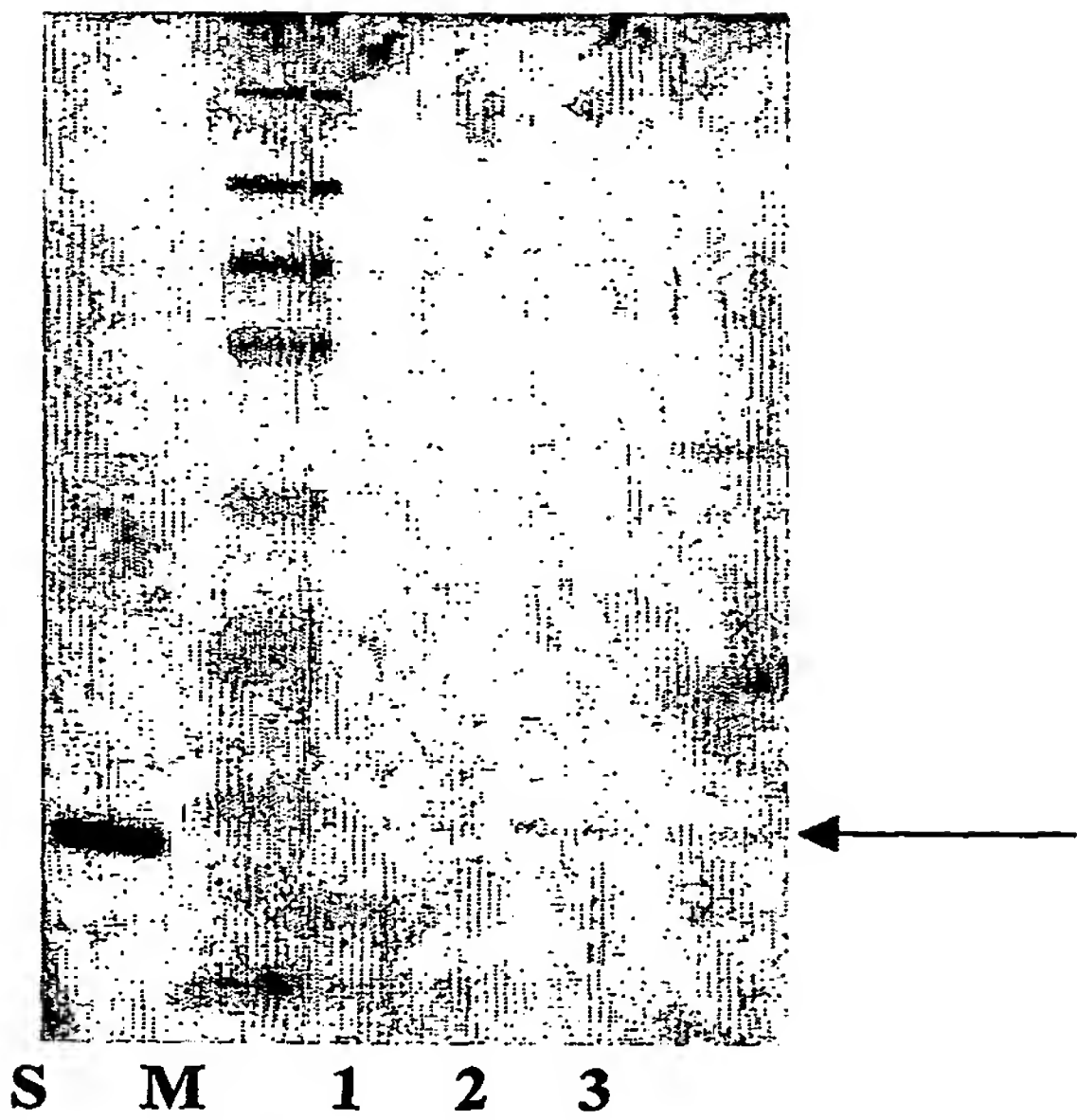


图 9

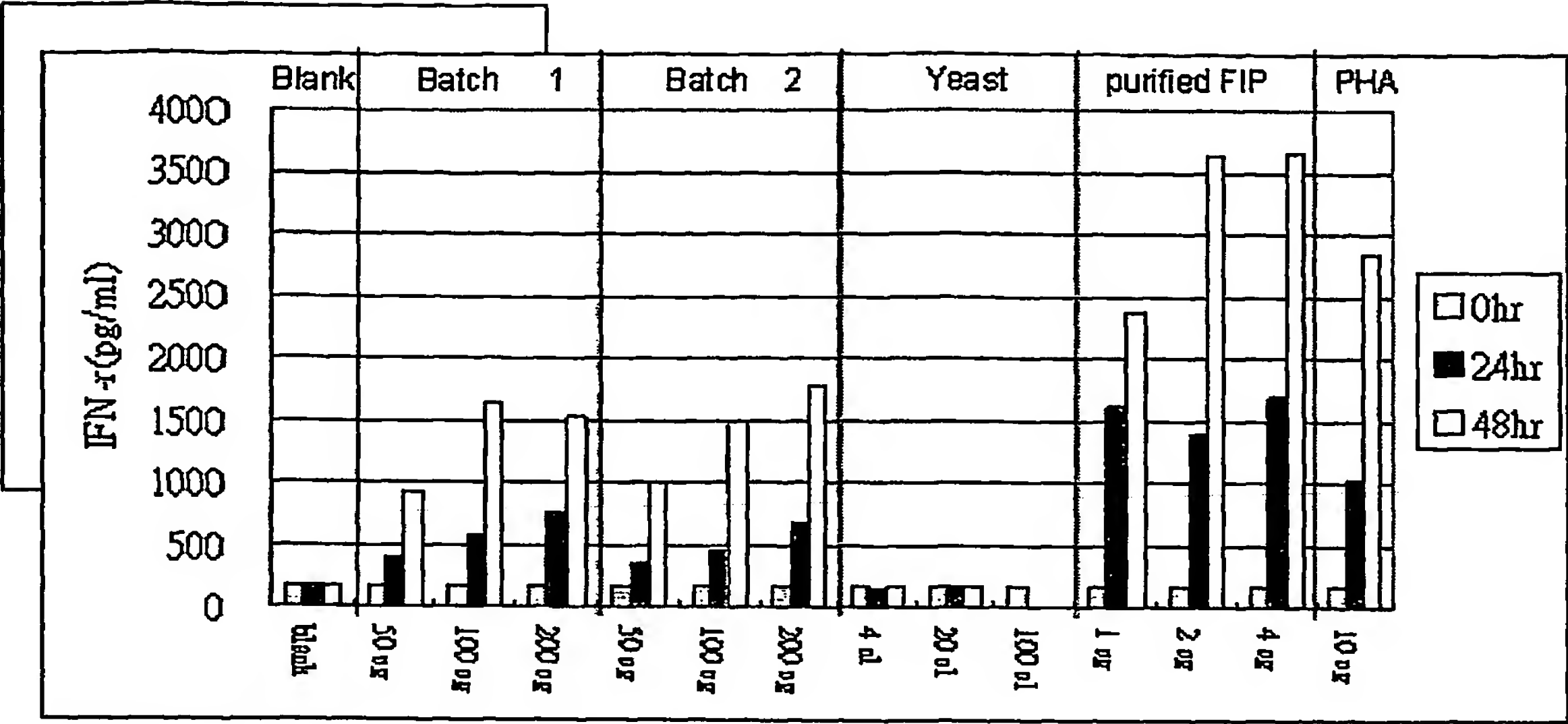


图 10



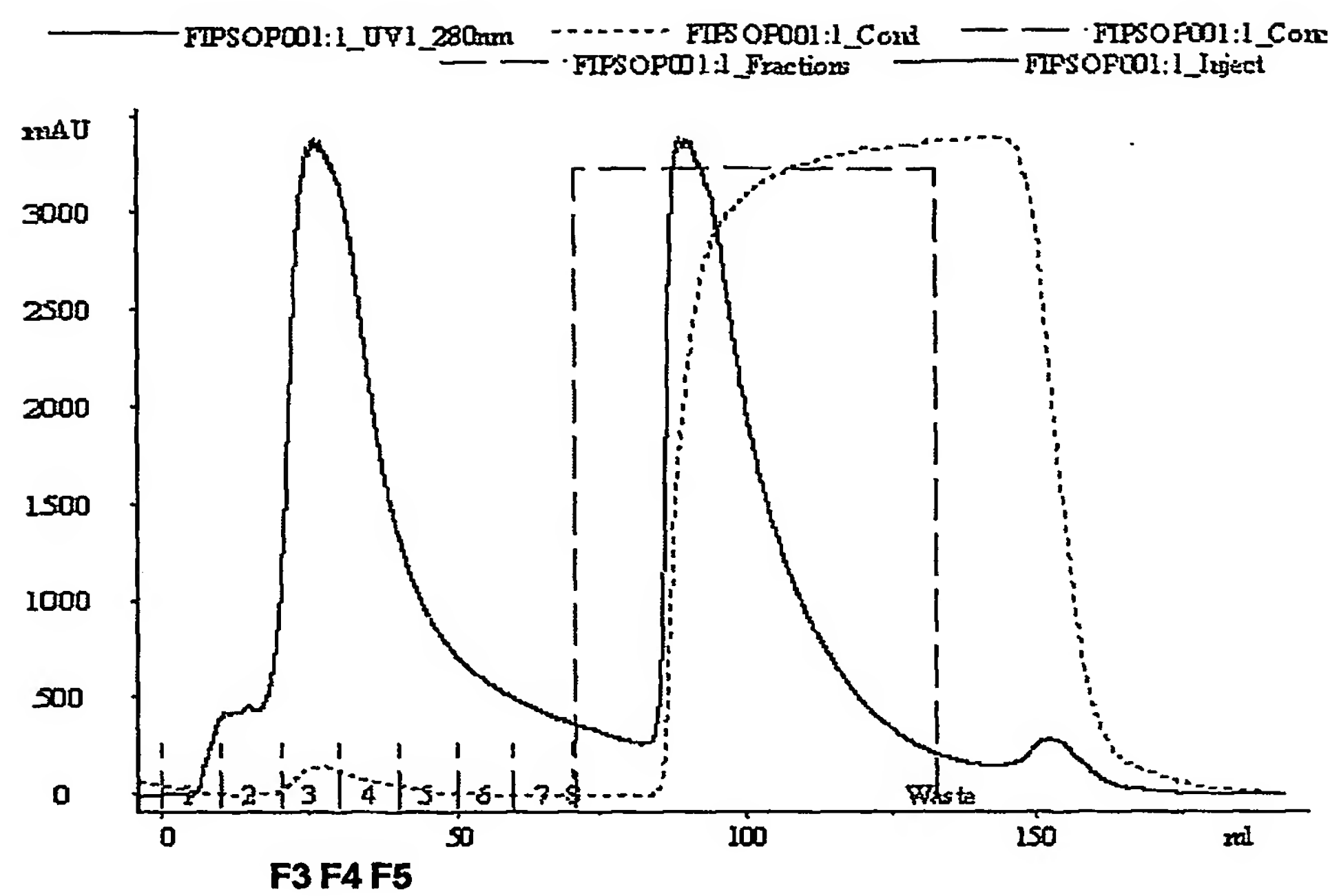


图 11(I)

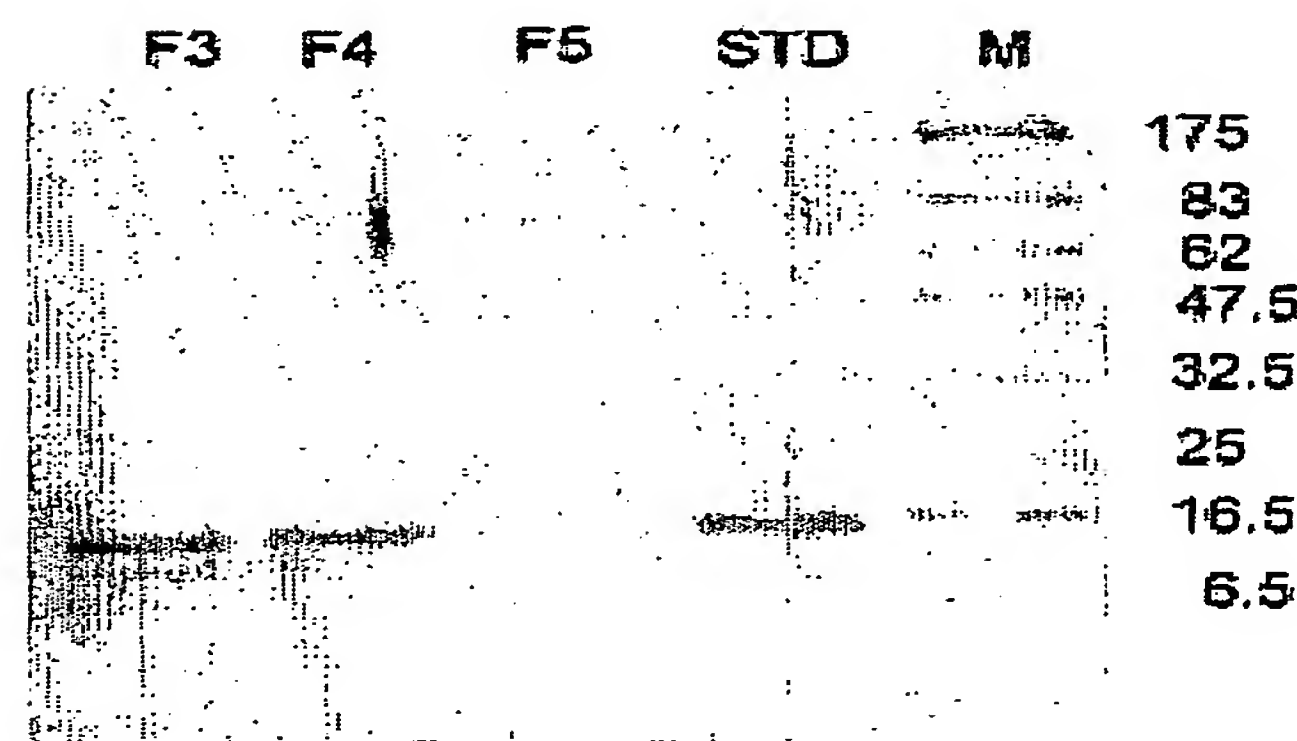


图 11(II)

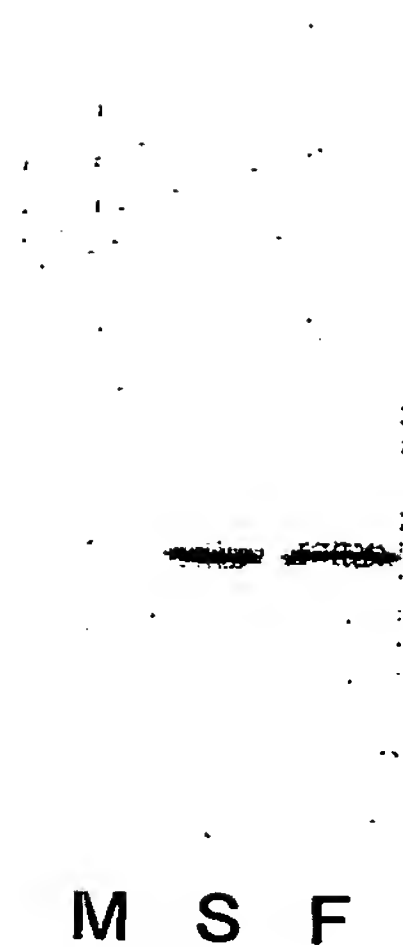


图 12

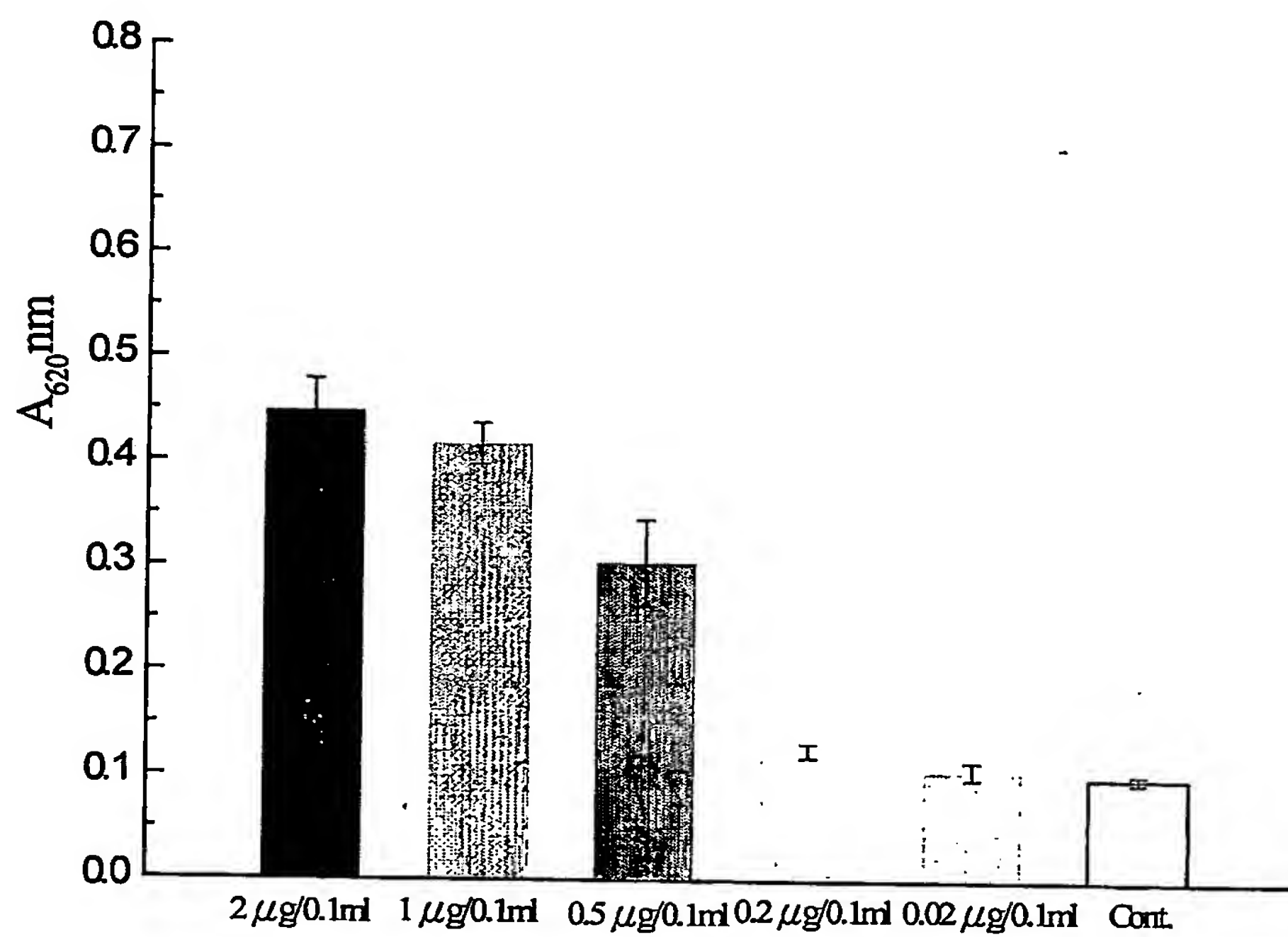


图 13

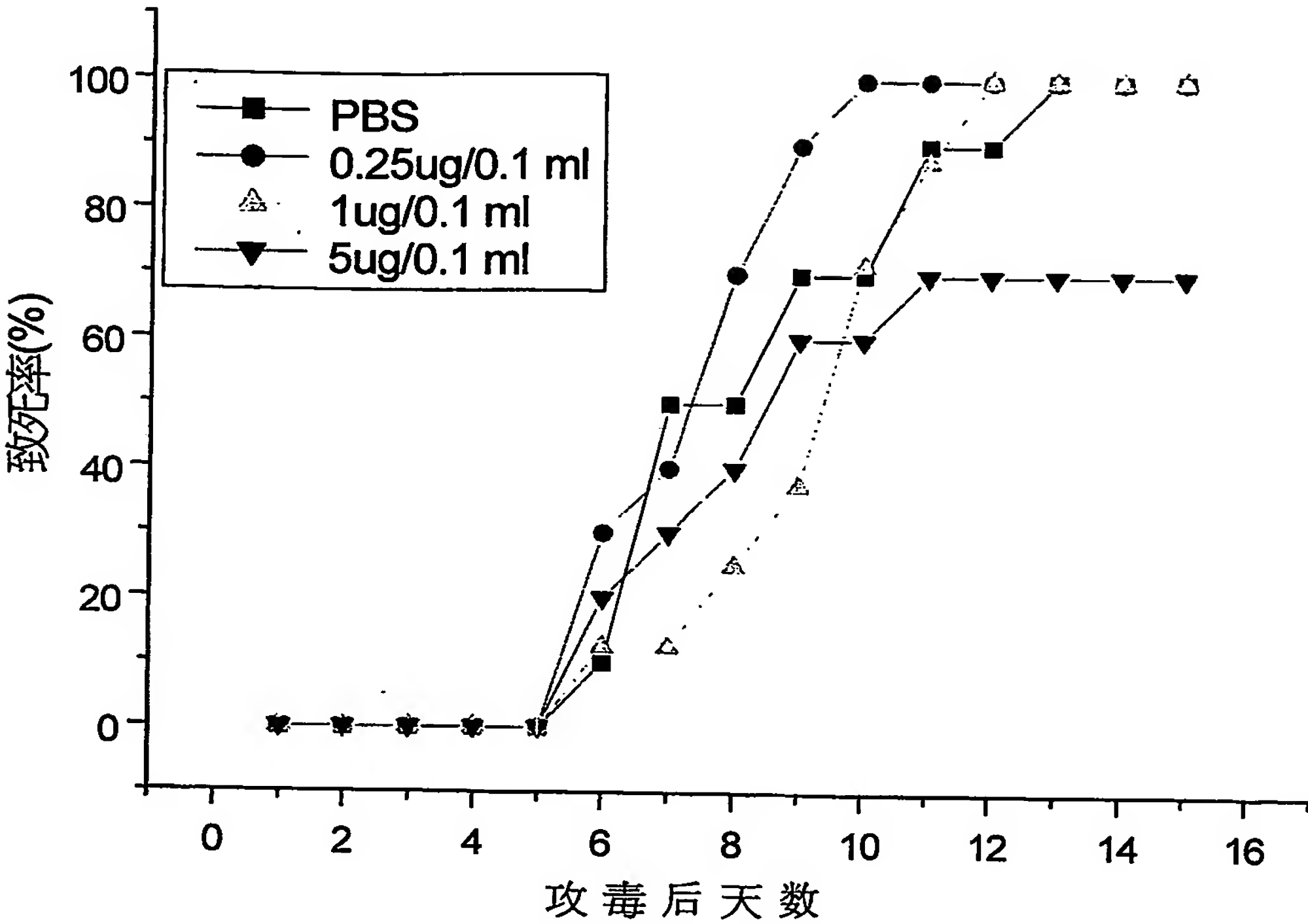


图 14



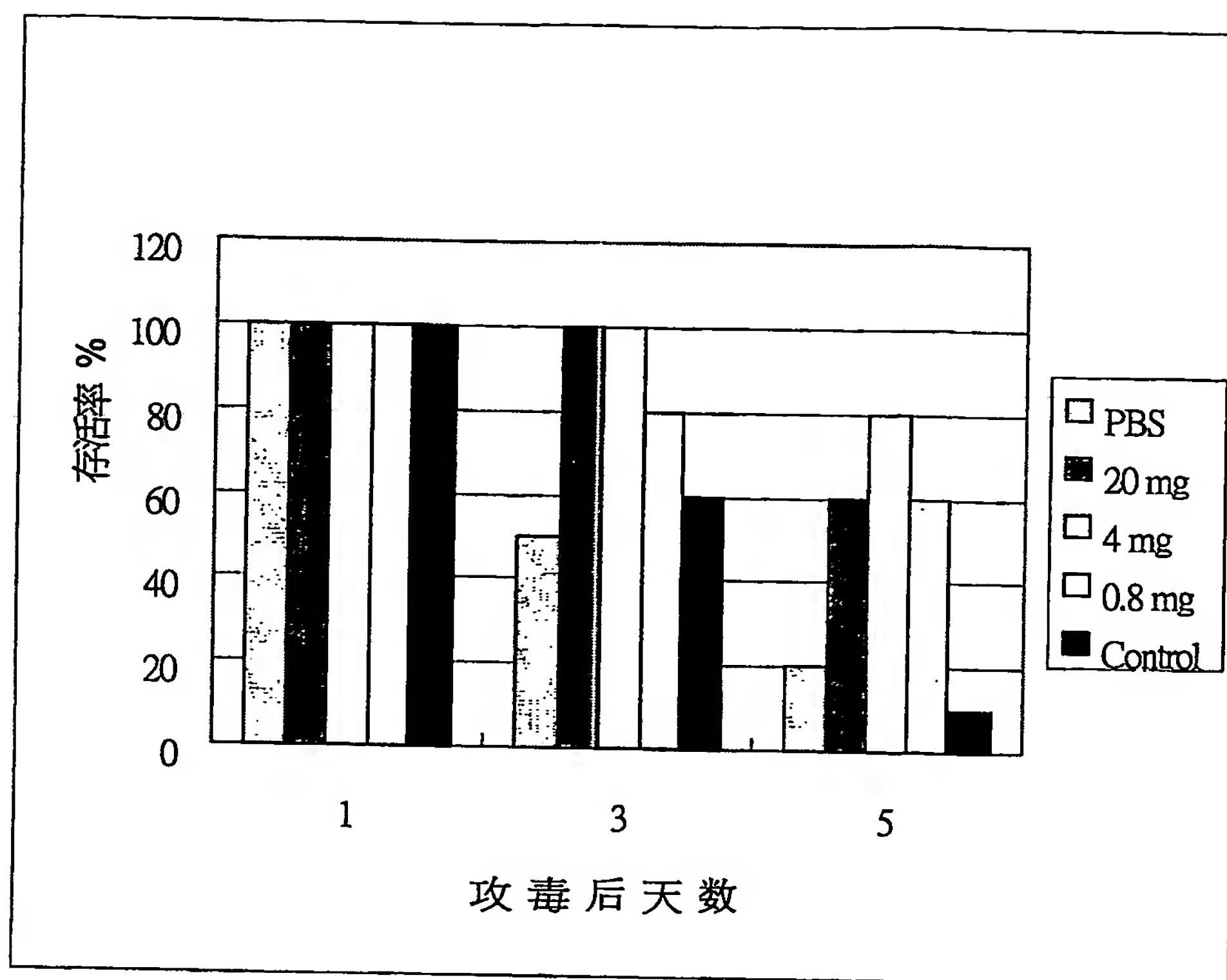


图 15

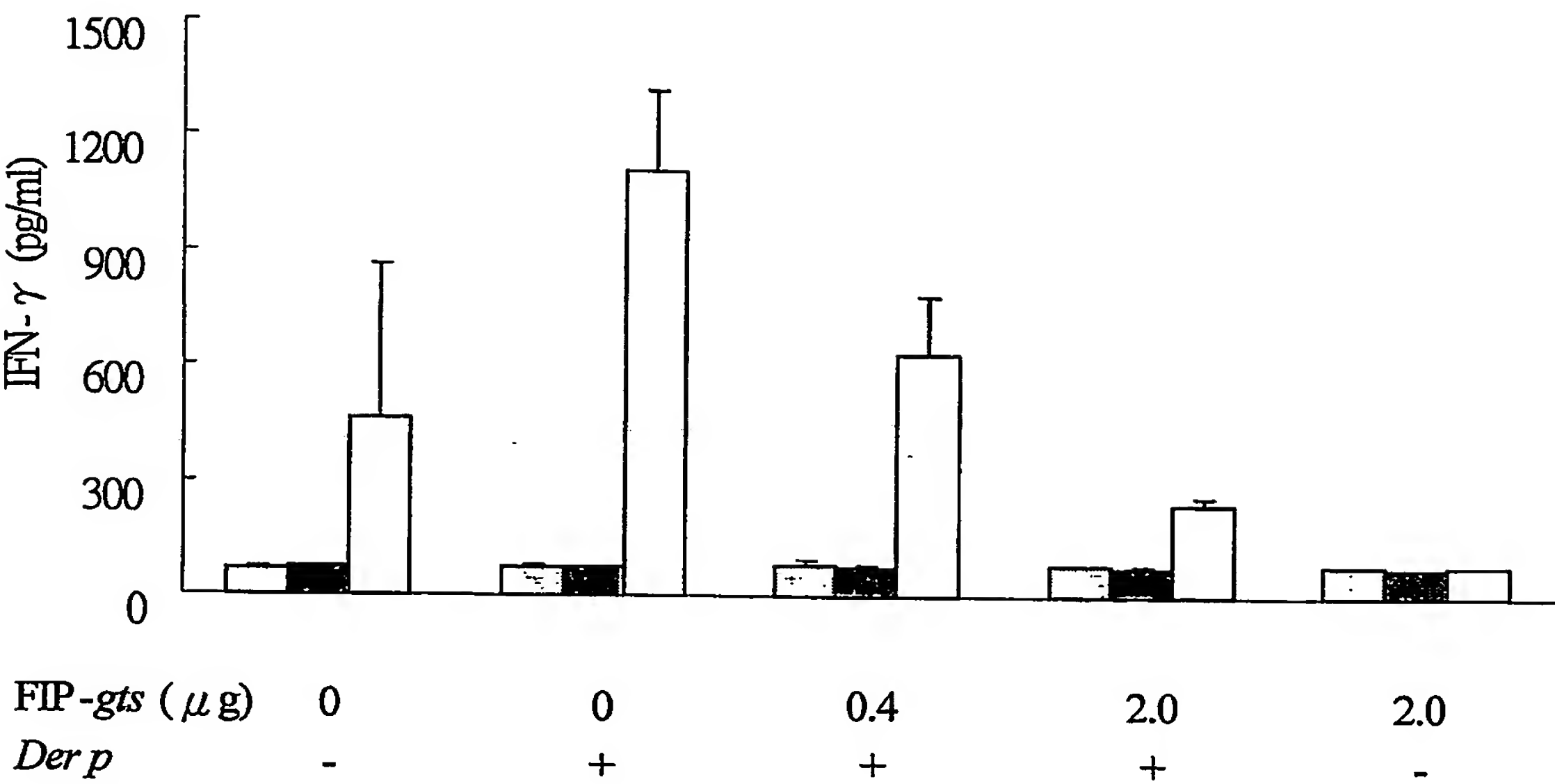


图 16

序 列 表

<110> 益生生技开发股份有限公司

宝纳纯生技公司

<120> 利用微生物制备的真菌免疫调节蛋白及其用途

<130> ZP041151TCP

<150> US 60/503, 547

<151> 2003-09-17

<160> 1

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 336

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 编码真菌免疫调节蛋白的核酸分子

<400> 1

atgtctgata ctgctttgat tttcagattg gcttgggatg ttaagaagtt gtcttttcgat	60
tacactccaa actggggtag aggtaaccca aacaacttca ttgatactgt tactttccca	120
aaggttttga ctgataaggc ttacacttac agagttgctg tttctggtag aaacttgggt	180
gttaagccat cttacgctgt tgaatctgat ggttctcaaa aggttaactt cttggaatac	240
aactctgggtt acggtattgc tgatactaac actattcaag ttttcgttgt tgatccagat	300
actaacaacg atttcattat tgctcaatgg aactga	336

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/CN2004/001044

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC7: C12N15/10, 15/62, 15/80, 15/81, 15/64, C07K14/37, A61K35/84, A61P37/00, 37/06, 3/10, 31/04, 31/12  
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N C07K A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

CNKI

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNPAT WPI EPODOC PAJ CA( immuno+ ganoderma fung+ myco+ etal)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP2032026A, 01.02.1990, see claims and examples	21, 24-28
X	THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, VOL.264, NO.1, 1989, Kohsuke kino et al, " Isolation and Characterization of a New Immunomodulatory Proein, Ling Zhi-8(LZ-8), from <i>Ganoderma lucidium</i> ", Pages 472-478.	21
X	Eur. J. Biochem. VOL. 228 , 1995 , Ko et al , " A new fungal immunomodulatory protein, FIP-fve isolated from the edible mushroom, Flammulina velutipes and its complete amino acid sequence", Pages 244-249.	21

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
16. Nov.2004(16.11.2004)

Date of mailing of the international search report  
09 · DEC 2004 (09 · 12 · 2004)

Name and mailing address of the ISA/CN  
6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District,  
100088 Beijing, P.R.China

Authorized officer

Telephone No. (86-10)62085300



Facsimile No. (86-10)62019451



International application No.  
PCT/CN2004/001044

PCT/CN2004/001044

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
-----------	--	-----------------------

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (January 2004)

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2004/001044

## Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:29-30  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claims Nos. 29-30 relate to methods for treatment of the human or animal body.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a)

## Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

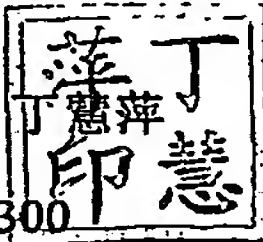
**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.  
PCT/CN2004/001044

Patent document Cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
JP2032026 A	01-02-1990	NONE	NONE
US5334704A	02-08-1994	EP0288959 A	02-11-1988
		JP1027490 A	30-01-1989
		EP0288959 B1	12-01-1994
		DE3886986G	24-02-1994
		JP7022516B	15-03-1995

## 国际检索报告

国际申请号  
PCT/CN2004/001044

<b>A. 主题的分类</b> IPC7: C12N15/10, 15/62, 15/80, 15/81, 15/64, C07K14/37, A61K35/84, A61P37/00, 37/06, 3/10, 31/04, 31/12 按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类		
<b>B. 检索领域</b>		
检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) C12N C07K A61K A61P		
包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 CNKI		
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNPAT WPI EPODOC PAJ CA(免疫 灵芝 真菌 immuno+ ganoderma fung+ myco+ etal)		
<b>C. 相关文件</b>		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	JP2032026A, 1990 年 2 月 1 日, 权利要求和实施例	21、24-28
X	THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 第 264 卷, 第 1 期, 1989 年出版, Kohsuke kino 等, "Isolation and Characterization of a New Immunomodulatory Proein, Ling Zhi-8(LZ-8), from <i>Ganoderma lucidium</i> ", 第 472-478 页。	21
X	Eur. J. Biochem. 第 228 卷, 1995 年出版, Ko 等, "A new fungal immunomodulatory protein, FIP-five isolated from the edible mushroom, <i>Flammulina velutipes</i> and its complete amino acid sequence", 第 244-249 页。	21
X	US5334704A, 1994 年 8 月 2 日 (02.08.1994), 全文	21
X	药物生物技术, 第 9 卷, 第 1 期, 2002 年出版, 叶波平等, "LZ-8 基因在大肠杆菌中的表达", 第 21-23 页	21
A	湖南中医药导报, 第 5 卷, 第 10 期, 1999 年 10 月出版, 邱赛红等, "灵芝的药理研究概况", 第 19-21 页	1-28
<input type="checkbox"/> 其余文件在 C 栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。		
<b>* 引用文件的具体类型:</b> "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 "T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期 16.11 月 2004 (16.11.2004)		国际检索报告邮寄日期 09.12月2004 (09.12.2004)
中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088 传真号: (86-10)62019451		授权官员  电话号码: (86-10)62085300

# 国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2004/001044

## 第II栏 关于某些权利要求不能作为检索主题的意见(接第1页第2项)

按条约 17(2)(a)对某些权利要求未作国际检索报告的理由如下:

1. ☒ 权利要求: 29-30

因为它们涉及到不要求本国际检索单位进行检索的主题, 即:

权利要求 29-30 涉及人体或动物体的治疗方法。

2. ☐ 权利要求:

因为它们涉及到国际申请中不符合规定的要求的部分, 以致不能进行任何有意义的国际检索, 具体地说:

3. ☐ 权利要求:

因为它们是从属权利要求, 并且没有按照细则 6.4(a)第 2 句和第 3 句的要求撰写。

## 第II栏 关于缺乏发明单一性时的意见(接第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明, 即:

1. ☐ 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费, 本国际检索报告针对全部可作检索的权利要求。

2. ☐ 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索, 本国际检索单位未通知缴纳任何附加费。

3. ☐ 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费, 本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求。具体地说, 是权利要求:

4. ☐ 申请人未按时缴纳被要求的附加检索费。因此, 本国际检索报告仅涉及权利要求中首次提及的发明; 包含该发明的权利要求是:

关于异议的说明: ☐ 申请人的异议书随附加检索费同时提交。

☐ 支付附加检索费时未提交异议书。



国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号  
PCT/CN2004/001044

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
JP2032026 A	01-02-1990	无	无
US5334704A	02-08-1994	EP0288959 A	02-11-1988
		JP1027490 A	30-01-1989
		EP0288959 B1	12-01-1994
		DE3886986G	24-02-1994
		JP7022516B	15-03-1995